

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析雷公藤配伍甘草治疗 肾病综合征大鼠的尿液代谢组学

杨瑞, 唐思, 董晓茜, 张世良, 刘君, 靖博宇, 孙丽丽, 夏素霞\*  
(辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034)

**[摘要]** **目的:**考察雷公藤配伍甘草对肾病综合征大鼠尿液中内源性代谢产物的影响,通过尿液代谢组学技术探讨该药对的作用机制。**方法:**大鼠随机分为4组,分别为空白组、模型组、雷公藤单独给药组(TPW组)和雷公藤配伍甘草给药组(TPW-GLY组)。采用UPLC-Q-TOF-MS,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),对尿液样品的代谢物图谱进行模式识别及生物标记物的筛选与鉴定。**结果:**空白组,模型组,TPW组及TPW-GLY组的代谢轮廓有明显差异,筛选并鉴定出空白组与模型组间具有显著性差异的生物标记物29个,其中受TPW-GLY组回调的生物标记物14个,受TPW组回调的生物标记物11个;TPW-GLY组和TPW组显著差异物7个,分别为N-乙酰谷氨酸,二羧基粪甾烷酸,烟尿酸,12-酮脱氧胆酸,甘油三酯(16:0/16:0/20:4),泛醌Q2和1,3,7-三甲基尿酸。**结论:**雷公藤与甘草配伍给药后,可能通过改善肾病综合征大鼠体内的氨基酸代谢、胆汁酸代谢、脂肪及脂肪酸代谢、能量代谢及嘌呤代谢等过程,改善了疾病状态,进而起到减毒增效的作用。

**[关键词]** 雷公藤; 甘草; 配伍; 肾病综合征; 代谢组学; 生物标记物; 代谢途径

**[中图分类号]** R22;R24;R289;R969.1;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0150-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181106

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1011.034.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-15 11:24

## Analysis of Urine Metabonomics of Nephrotic Syndrome Rats Treated with Compatibility of Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Based on UPLC-Q-TOF-MS

YANG Rui, TANG Si, DONG Xiao-qian, ZHANG Shi-liang, LIU Jun, JING Bo-yu, SUN Li-li, XIA Su-xia\*  
(Academe of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province, Shenyang 110034, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the changes of endogenous metabolites in urine of nephrotic syndrome rats treated by compatibility of Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, and to explore its mechanism by urine metabonomics. **Method:** Rats were randomly divided into 4 groups, including the blank group, the model group, the Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma (TPW) group and the compatibility of Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (TPW-GLY) group. All urine samples were determined by UPLC-Q-TOF-MS. Data was analyzed by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Result:** The urine metabolite profiles in 4 groups were separated obviously. Twenty-nine biomarkers with significant difference were identified between the blank group and the model group, and 14 biomarkers were recovered by the administration of TPW-GLY, and 11 biomarkers were recovered by the administration of TPW. There were 7 biomarkers between TPW group and TPW-

**[收稿日期]** 20171101(009)

**[基金项目]** 辽宁省博士启动基金项目(201601384);辽宁省自然科学基金项目(2015020675)

**[第一作者]** 杨瑞,博士,副研究员,从事中药药代动力学及代谢组学研究,Tel:024-86803043,E-mail:yang\_rui1983@163.com

**[通信作者]** \*夏素霞,研究员,从事中药药代动力学及代谢组学研究,Tel:024-86803043,E-mail:xiasuxiazfq@163.com

GLY group as *N*-acetylglutamic acid, dihydroxycoprostanic acid, nicotinuric acid, triglyceride (16:0/16:0/20:4), 12-ketodeoxycholic acid, ubiquinone Q2, 1, 3, 7-trimethyluric acid. **Conclusion:** After compatibility with *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma* may take effect on nephrotic syndrome rats through the regulation of amino acid metabolism, bile acid metabolism, fatty acid and fat metabolism, energy metabolism, purine metabolism and other processes.

**[Key words]** *Tripterygii Wilfordii Radix et Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; compatibility; nephrotic syndrome; metabonomics; biomarkers; metabolic pathway

雷公藤味苦、辛,性寒,有剧毒。其对肾病<sup>[1]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[2]</sup>等难治性疾病具有很好的治疗效果,但又具有明显的胃肠道毒性<sup>[3]</sup>、肝毒性<sup>[4]</sup>、肾毒性<sup>[5]</sup>、血液系统毒性<sup>[6]</sup>、心血管系统毒性<sup>[7]</sup>及生殖系统毒性<sup>[8]</sup>等,这些问题都极大限制了雷公藤在临床中应用。甘草味甘,性平,其组方作用有 3 种,①益气补中助臣药补虚扶正之力;②解药毒削减君药之毒性;③调和诸药使全方标本兼治,祛邪而无伤正之忧,扶正而无恋邪之虞,为使药。

文献报道甘草可以干预雷公藤内酯酮毒性<sup>[9]</sup>,但未进行雷公藤提取物的毒性代谢组学研究。本课题组前期药理研究表明,雷公藤提取物和甘草提取物配伍对肾病综合征大鼠的血液学指标具有一定的改善作用,表明甘草在一定程度上对雷公藤起到了减毒增效作用<sup>[10]</sup>。本实验采用雷公藤与甘草最佳配伍比例给药,基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术进行阿霉素肾病综合征模型大鼠的尿液代谢组学分析,找到与该证发生密切相关的代谢组学特征和生物标记物,进一步探讨雷公藤配伍甘草治疗肾病综合征的作用机制。

## 1 材料

ACQUITY UPLC™型超高效液相色谱仪和 Xevo G2-XS 型飞行时间质谱(美国 Waters 公司),XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),3-18K 型低温冷冻高速离心机(德国 Sigma 公司),Milli-Q Reference 型超纯水系统(德国默克公司),DW-86L386 型超低温保存箱(青岛海尔股份有限公司)。

雷公藤乙酸乙酯提取物、甘草水提取物均由沈阳药科大学宋少江教授课题组提供,注射用盐酸多柔比星(阿霉素,海正辉瑞制药有限公司,规格 10 mg/支,批号 16018711),水为自制超纯水,乙腈为质谱纯,异丙醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(辽)2015-0001。于辽宁省中医药研究院实验动物

中心适应性饲养 1 周,室温 20 ~ 23 °C,湿度 50% ~ 60%。本文涉及的动物实验均经辽宁省中医药研究院实验动物伦理委员会批准,批准号 2017006。

## 2 方法与结果

**2.1 动物分组及给药** 大鼠适应性饲养 1 周后,取 10 只作为空白组,其余大鼠按剂量 6.5 mg·kg<sup>-1</sup>一次性尾静脉注射盐酸多柔比星造肾病综合征模型,分别于造模后第 7,14 天在代谢笼中收集 24 h 尿液测定尿蛋白,取每 24 h 尿蛋白质量 > 100 mg 为肾病模型成立。造模成功的大鼠随机分为模型组、雷公藤单独给药组(TPW 组)及雷公藤配伍甘草给药组(TPW-GLY 组),每组各 10 只大鼠。于造模后第 15 天开始给药,TPW 组灌胃给予 240 mg·kg<sup>-1</sup>雷公藤提取物[用 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液配制],TPW-GLY 组灌胃给予 240 mg·kg<sup>-1</sup>雷公藤提取物 + 80 mg·kg<sup>-1</sup>甘草提取物(用 1% CMC-Na 溶液配制),空白组和模型组灌胃给予等量的 1% CMC-Na 溶液,给药体积均为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,每日 1 次,连续给药 14 d。分别测定造模后 7,14 d 及给药后 14 d 的大鼠 24 h 尿蛋白含量,结果见表 1。

表 1 不同组别大鼠 24 h 尿蛋白的定量分析( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Quantitative analysis of 24 h urinary protein in rats from each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	造模 7 d	造模 14 d	给药 14 d
空白	-	27.09 ± 7.50	30.07 ± 5.99	29.41 ± 6.57
模型	-	63.52 ± 24.84 <sup>1)</sup>	150.34 ± 29.57 <sup>1)</sup>	175.44 ± 42.58 <sup>1)</sup>
TPW	240	61.39 ± 15.59 <sup>1)</sup>	160.07 ± 41.95 <sup>1)</sup>	155.05 ± 17.99 <sup>1)</sup>
TPW-GLY	240 + 80	63.13 ± 26.98 <sup>1)</sup>	161.00 ± 38.02 <sup>1)</sup>	133.91 ± 19.44 <sup>1,2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05;与 TPW 组比较<sup>3)</sup>P < 0.05。

由表 1 可知,造模 7 d 后,与空白组相比,模型组、给药组大鼠的 24 h 尿蛋白显著升高,但未达到肾病综合征指标。造模 14 d 后,大鼠 24 h 尿蛋白质量 > 100 mg,表明造模成功。给药 14 d 后,模型组大鼠尿蛋白含量继续升高,TPW 组大鼠尿蛋白含量

略有下降,但与模型组相比无显著性差异,TPW-GLY 组大鼠尿蛋白含量显著下降,与模型组以及 TPW 组相比具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),表明雷公藤单独给药对大鼠尿蛋白的改善效果不明显,与甘草配伍后对肾病综合征大鼠的尿蛋白进行了显著回调。

**2.2 尿样采集** 分别将大鼠置于清洁代谢笼中,收集大鼠 8 h 尿液。收集尿液的试管需放置于装有冰块的烧杯中,并在试管中加入  $\text{NaN}_3$  100  $\mu\text{L}$  作为抑菌剂。将收集好的尿液转移至离心管中,于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

**2.3 样品处理** 将尿液样品放置于冰上解冻,精密吸取尿液样品 200  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中,加入异丙醇 600  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s,离心 ( $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min,下同),取上清液于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  氮气下吹干,加流动相 100  $\mu\text{L}$  复溶,离心,取上清液进样分析。

#### 2.4 检测条件

**2.4.1 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}, 1.7\ \mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min,2%~25% B;1~4 min,25% B;4~5 min,25%~50% B;5~7 min,50%~60% B;7~10 min,60%~90% B;10~12 min,90%~100% B;12~14 min,100% B),流速设定  $0.4\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

**2.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI),分别进行正、负离子扫描,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 40 V,离子源温度  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ,脱溶剂气温度  $450\text{ }^\circ\text{C}$ ,反向锥孔气流  $50\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,脱溶剂气流速选择  $800\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,低电压 6 V,高电压 10~40 V,扫描时间设定 0.2 s,扫描范围  $m/z$  100~1 200,数据采集形式 MS continuum,准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽溶液 ( $\text{ESI}^+ m/z$  556.277 1,  $\text{ESI}^- m/z$  554.261 5) 为锁定质量溶液。

**2.5 数据处理与分析** 将 UPLC-Q-TOF-MS 获得的原始数据导入 Progenesis Q1 软件进行峰提取、峰匹配及归一化前处理,再将前处理的数据导入 Ezinfo 3.0.1.0 软件进行模式识别及判别分析。采用主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对样品进行多变量统计分析得到差异代谢物。将数据库中化合物的碎片峰与样品中化合物碎片峰进行比对,并结合文献[9],对这些化合物进行筛选,推测可能的生物标记物及相关代谢通路。

#### 2.6 代谢组学分析

**2.6.1 尿液样品的 UPLC-Q-TOF-MS 代谢物谱分析** 大鼠尿液代谢产物的轮廓图见图 1。结果发现各

组大鼠尿液代谢物轮廓发生了不同程度的改变,可通过进一步分析找出组间差异。

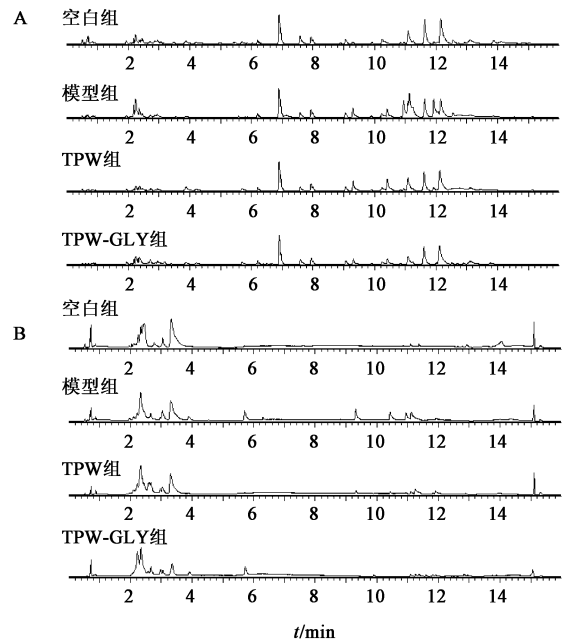
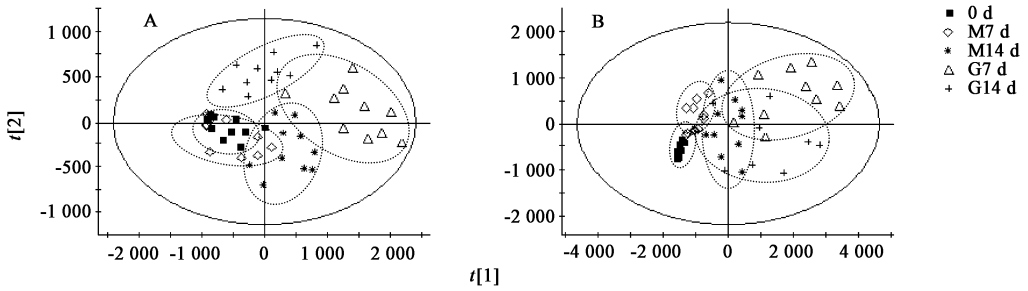


图 1 正离子(A)和负离子(B)模式下大鼠尿液 UPLC-Q-TOF-MS 的总离子流

Fig.1 Total ion current chromatograms of rat urine samples under positive ion mode (A) and negative ion mode (B) of UPLC-Q-TOF-MS

**2.6.2 模式识别与判别分析** 将 Progenesis Q1 软件处理的数据导入 Ezinfo 3.0.1.0 软件进行模式识别,采用 PCA 对 UPLC-Q-TOF-MS 数据进行降维处理,分析 TPW-GLY 组大鼠造模前以及造模 7 d,造模 14 d,连续给药 7 d,给药 14 d 大鼠尿液内源性代谢物谱的变化,见图 2。结果发现造模 7 d 与造模前差异不大,造模 14 d 尿液代谢物谱变化较大,连续给药 7 d 代谢物谱仍然继续偏离,表明连续给药 7 d 未能纠正病证;连续给药 14 d 后,代谢物谱明显向造模前靠近,表明连续给药 14 d 对肾病综合征大鼠尿液代谢物谱进行了回调。

各组大鼠尿液内源性代谢物谱的 PCA 得分见图 3。结果发现模型组与空白组的代谢轮廓呈明显的分离趋势,表明代谢物谱存在明显差异。TPW 组给药后代谢物谱继续偏离空白组,但是比模型组接近空白组,表明 TPW 给药具有一定的回调作用。TPW-GLY 组给药后代谢物谱明显向空白组靠近,表明 TPW-GLY 给药对尿液代谢物谱进行了显著回调。采用 OPLS-DA 考察空白组和模型组样品,结果空白组和模型组的样本分别聚集为 2 组。对 OPLS-DA 模型进行评价,结果表明该模型方差  $R^2 =$



0 d. 造模前; M7 d. 造模后 7 d; M14 d. 造模后 14 d; G7 d. 给药后 7 d; G14 d. 给药后 14 d  
图 2 TPW-GLY 组大鼠尿液样本正离子(A)和负离子(B)模式下代谢产物的 PCA 得分

Fig. 2 PCA score plots of metabolites in rat urine samples of TPW-GLY group under positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

0.999 6/0.995 4 (正离子模式/负离子模式), 模型  
预测值方差  $Q^2 = 0.969 6/0.914 8$  (正离子模式/

负离子模式), 说明该模型稳定性和预测性均  
较好。

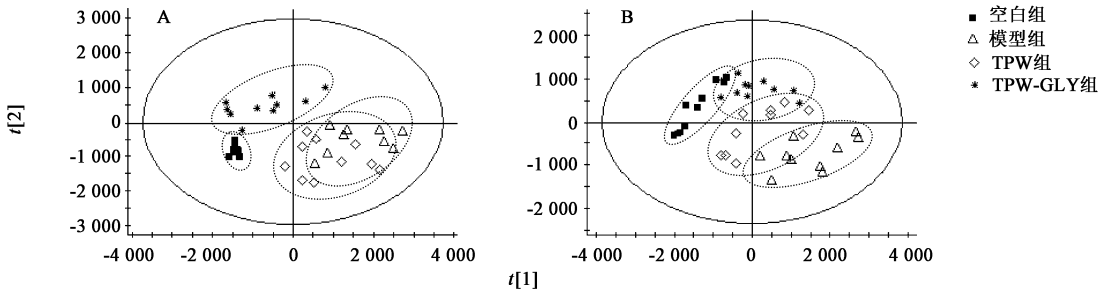


图 3 各组大鼠尿液样本正离子(A)和负离子(B)模式下代谢产物的 PCA 得分

Fig. 3 PCA score plots of metabolites in rat urine samples of different groups under positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

**2.6.3 差异代谢物的鉴定** 取变量投影重要性 (VIP) > 1.0,  $P < 0.05$ , 最大倍数变化 (max fold change)  $\geq 2$ , 筛选并鉴定出空白组与模型组间具有显著性差异的生物标记物 29 个 (正离子模式 21 个, 负离子模式 8 个), 见表 2。这些物质可以认为是肾病综合征的生理内源性代谢物中的潜在生物标记物, 表明肾病综合征大鼠的氨基酸代谢、胆汁酸代谢、脂肪酸代谢、磷脂代谢、肾素-血管紧张素代谢、嘌呤代谢、能量代谢均发生了不同程度的变化。以上述 29 个差异物为指标, 在 4 组间进行比较, 评价各指标在 TPW 组和 TPW-GLY 组中是否具有回调趋势。结果表明 TPW-GLY 组中鉴定可被回调的生物标记物 14 个 (正离子模式 11 个, 负离子模式 3 个), 这 14 个生物标记物中有 11 个在 TPW 组中被回调。比较上述 14 个生物标记物在 TPW 组和 TPW-GLY 组之间的差异, 最终鉴定了 7 个生物标记物, 分别为 *N*-乙酰谷氨酸, 二羟基粪甾烷酸, 烟尿酸, 12-酮脱氧胆酸, 甘油三酯 (16:0/16:0/20:4), 泛醌 Q2 和 1,3,7-三甲基尿酸。这 7 种生物标记物在各组间的变化趋势见图 4, 结果表明雷公藤与甘

草配伍后改变了这 7 种物质在尿液中的含量, 从而起到了减毒增效的作用。

### 3 讨论

本研究采用的动物模型为阿霉素微小病变型肾病模型, 阿霉素的代谢产物能诱发实验动物肾小球上皮细胞脂质过氧化, 使肾小球上皮细胞糖蛋白的代谢遭到破坏, 中性粒细胞趋化刺激肾小球, 肾小球合成前列腺素、血栓素加速, 肾小球滤过膜结构的完整性和功能受损, 膜滤过屏障病变, 直接引起肾小球硬化、肾间质纤维化, 甚至肾功能衰竭。表现为大量蛋白尿、低蛋白血症、高度水肿、高脂血症的一组临床证候群<sup>[11-12]</sup>。在本实验中, 模型组及给药组采集的尿液样本为高蛋白尿, 因此采用异丙醇沉淀蛋白对样品进行前处理。研究表明肾病综合征大鼠体内的氨基酸代谢、胆汁酸代谢、脂肪酸代谢、磷脂代谢、肾素-血管紧张素代谢、嘌呤代谢及能量代谢等发生了变化, 雷公藤单独给药可对 11 个生物标记物进行小幅度回调, 而雷公藤甘草配伍给药对 14 个体内生物标记物进行了显著回调, 改善了大鼠的疾病状态。

#### 3.1 氨基酸代谢 *N*-乙酰谷氨酸是在 *N*-乙酰谷氨

表 2 肾病综合征大鼠尿液的 29 种生物标记物及其代谢途径分析

Table 2 Analysis of 29 biomarkers in urine of nephrotic syndrome rats and their metabolic pathways

模式	No.	分子离子 $m/z$	$t_R$ /min	分子式	生物 标记物	$P$	被 TPW- GLY 回调	被 TPW 回调	代谢途径
正离子	1	379.1346	0.655	$C_7H_{11}NO_5$	<i>N</i> -乙酰谷氨酸 <sup>1)</sup>	0.0005	↓	↓	氨基酸代谢
	2	467.1875	0.697	$C_{10}H_{11}N_5O_2$	二羟基粪甾烷酸 <sup>1)</sup>	0.0032	↓	↓	胆汁酸代谢
	3	181.0609	0.704	$C_8H_8N_2O_3$	烟尿酸 <sup>1)</sup>	0	↓		脂肪酸代谢
	4	1046.5445	0.704	$C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$	血管紧张素 II	0.0001	↓	↓	肾素-血管紧张素代谢
	5	877.7238	0.868	$C_{55}H_{98}O_6$	甘油三酯(16:0/16:0/20:4) <sup>1)</sup>	0.0028	↓	↓	脂肪代谢
	6	744.5536	0.868	$C_{41}H_{78}NO_8P$	磷脂酰乙醇胺(18:1/18:1)	0.0158	↓		磷脂代谢
	7	413.2650	2.159	$C_{24}H_{38}O_4$	12-酮脱氧胆酸 <sup>1)</sup>	0	↑	↑	胆汁酸代谢
	8	340.3563	2.209	$C_{22}H_{45}NO$	二十二酰胺	0	↑	↑	脂肪代谢
	9	855.7396	2.237	$C_{53}H_{100}O_6$	甘油三酯(16:0/16:1/18:0)	0	↓	↓	脂肪代谢
	10	855.7398	4.069	$C_{55}H_{98}O_6$	甘油三酯(16:1/18:1/18:2)	0.0049	↓	↓	脂肪代谢
	11	879.7373	5.666	$C_{55}H_{100}O_6$	甘油三酯(16:1/18:1/18:1)	0	↓	↓	脂肪代谢
	12	259.0922	5.987	$C_5H_7NO_3$	焦谷氨酸	0			氨基酸代谢
	13	217.1295	6.329	$C_8H_{16}N_4O_3$	<i>N</i> -α-乙酰- <i>L</i> -精氨酸	0.0002			氨基酸代谢
	14	282.1193	11.790	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	1-甲基腺苷	0.0464			嘌呤代谢
	15	166.0722	11.861	$C_6H_7N_5O$	7-甲基鸟嘌呤	0			嘌呤代谢
	16	190.0497	12.488	$C_{10}H_7NO_3$	犬尿酸	0.0469			色氨酸代谢
	17	162.0547	12.674	$C_9H_7NO_2$	2-咪唑甲酸	0.0111			酪氨酸代谢
	18	648.3379	13.821	$C_{32}H_{51}NO_{11}$	甘氨酸脱氧胆酸钠-3-葡萄糖苷酸	0			胆汁酸代谢
	19	775.4146	14.007	$C_{40}H_{54}N_8O_8$	血管紧张素 IV	0			肾素-血管紧张素代谢
	20	297.1666	15.070	$C_{14}H_{26}O_5$	3-羟基十四烷二酸	0			脂肪酸代谢
	21	756.5505	15.112	$C_{40}H_{80}NO_8P$	<i>L</i> -1-磷脂酰乙醇胺	0			磷脂代谢
负离子	22	496.0960	0.718	$C_{16}H_{27}N_4O_8P_2S$	2-甲基-1-羟丙基-硫酸素焦磷酸	0	↓	↓	氨基酸代谢
	23	363.1812	2.665	$C_{19}H_{26}O_4$	泛醌 Q2 <sup>1)</sup>	0	↑		能量代谢
	24	419.1448	3.050	$C_8H_{10}N_4O_3$	1,3,7-三甲基尿酸 <sup>1)</sup>	0.0381	↓	↓	嘌呤代谢
	25	187.0977	3.100	$C_8H_{14}O_2$	2-辛烯酸	0.0007			脂肪酸代谢
	26	417.1298	3.820	$C_{10}H_{11}NO_4$	羟苯基甘氨酸	0.0022			酪氨酸代谢
	27	335.0412	14.349	$C_{11}H_{15}NO_9P$	烟酸单核苷酸	0.0002			能量代谢
	28	337.0553	15.105	$C_9H_{15}N_4O_8P$	5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸	0.0063			嘌呤代谢
	29	353.0501	15.112	$C_7H_6O_4$	龙胆酸	0.0015			酪氨酸代谢

注: <sup>1)</sup>TPW-GLY 组与 TPW 组间的差异物。

酸合成酶诱导下,由谷氨酸和乙酰辅酶 A 合成,参与精氨酸等氨基酸的生物合成。2-甲基-1-羟丙基-硫酸素焦磷酸是缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解中间体。本研究中 *N*-乙酰谷氨酸和 2-甲基-1-羟丙基-硫酸素焦磷酸在肾病综合征大鼠尿液中显著升高,与阿霉素肾病高蛋白尿现象吻合,TPW 和 TPW-GLY 给药后改善了尿液高蛋白现象,对其尿液含量进行了回调。

**3.2 胆汁酸代谢** 二羟基粪甾烷酸是胆汁酸在尿中的排泄物,能够转化为鹅去氧胆酸,参与肠道和肝脏中脂肪和甾醇的排泄、吸收和运输。12-酮脱氧胆酸也是胆汁酸的一种<sup>[13]</sup>,调节胆汁流动和脂质分泌,是吸收膳食脂肪和维生素的基础,可调节胆固醇平衡的所有关键酶。12-酮脱氧胆酸的含量下降阻碍了胆固醇的降解排泄,胆固醇在体内累积,与阿霉素肾病模型的高血脂现象一致,TPW 和 TPW-GLY

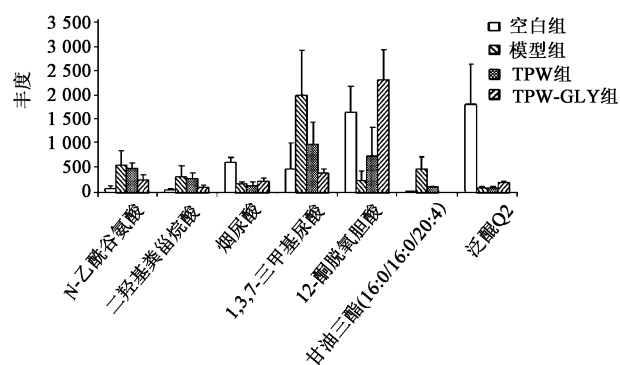


图 4 TPW 组和 TPW-GLY 组中 7 种差异生物标记物的变化趋势 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Trend of 7 biomarkers with difference between TPW group and TPW-GLY group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

干预对其进行了明显逆转。

**3.3 脂肪酸及脂肪代谢** 烟尿酸即酰基甘氨酸,可通过甘氨酸-N-酰基转移酶的作用而产生催化反应:酰基辅酶 A + 甘氨酸  $\rightleftharpoons$  辅酶 A + N-酰基甘氨酸,是脂肪酸的次要代谢物<sup>[14]</sup>。由于肾病综合征模型伴随高血脂现象,可能与脂肪酸  $\beta$ -氧化受阻相关,因而次级代谢产物烟尿酸含量下降。

研究中还发现,造模后的尿液中出现大量的甘油三酯,肉眼观察有乳糜尿现象。乳糜尿的发生是基于某种因素破坏了肾盂黏膜及黏膜下淋巴管,形成淋巴漏,在此基础上,如果合并淋巴循环障碍,淋巴管迂曲扩张,淋巴液返流,过多的淋巴液由肾盂处的瘘口流出,造成严重的淋巴漏,乳糜液流入尿中形成蛋白尿<sup>[15-16]</sup>。中医学认为乳糜尿的发病原因与脾肾二脏有密切关系。脾为生化之源,肾为藏精之所。脾虚则运化无权,肾亏则封藏失司,而致精微下泄,清浊不分,下经膀胱,故小便浑浊,如乳汁或如脂膏。所以乳糜尿的病因有脾阳下陷、中气不足、湿热下注和肾阴亏虚。《医学心悟》曰:“浊之因有二种,一由肾虚败精流注;一由湿热渗入膀胱,肾气虚,补肾之中必兼利水。盖肾经有二窍,溺窍开则精窍闭也。湿热者,导湿之中必兼理解,盖土旺则能胜湿,以土坚凝,则水自澄清也。”因此,推断所造肾病综合征模型大鼠肾功能损伤导致了乳糜尿的产生,给药治疗后乳糜尿消失。

**3.4 嘌呤代谢** 1,3,7-三甲基尿酸是尿酸的甲基衍生物,是尿结石的嘌呤成分。尿结石中的嘌呤衍生物可认为是嘌呤代谢异常的标志物。有报道显示肾病综合征患者更易合并高尿酸血症<sup>[17-18]</sup>,与本研究模型组尿液中 1,3,7-三甲基尿酸含量显著升高相吻合。

**3.5 肾素-血管紧张素代谢** 血管紧张素 II 是一种激素,可作用于中枢神经系统,调节肾交感神经活动、肾功能和血压。血管紧张素 II 是肾脏内产生,可通过一系列的非血流动力学作用介导组织损伤。血管紧张素 II 不仅参与调节血压和水钠平衡,控制其他神经体液系统,也会诱导产生过量活性氧和血管细胞凋亡、肥大、增殖和迁移。肾疾病导致肾血流量减少,促进肾小球旁器的球旁细胞分泌肾素,肾素进入血液后,使血中由肝生成的血管紧张素原水解为血管紧张素 I,随血液流经肺循环时,受肺所含的转化酶作用,被水解为八肽的血管紧张素 II,发挥拮抗转化生长作用,控制肾脏肥大细胞和细胞外基质的病变,缓解对肾功能的损害<sup>[19]</sup>。因而血管紧张素 II 含量在模型组中较高,给药干扰后水平下降。

**3.6 能量代谢** 泛醌是一种异戊二烯苯醌类化合物,泛醌 Q2 含有 2 个异戊二烯单元,是合成泛醌 Q10 的中间体,存在于细胞线粒体内膜上,参与细胞呼吸,与能量的制造及活化有关。泛醌 Q2 是脂溶性的,可以在细胞膜中移动,在电子传递链 (ETC) 中起着独特的作用。在细胞膜内,来自还原性辅酶 I (NADH) 和琥珀酸的电子通过呼吸链传递到氧,然后还原为水。呼吸链的电子传递导致  $H^+$  在膜上泵出,产生质子梯度,在三磷酸腺苷 (ATP) 合成酶作用下合成 ATP。本实验中,模型组大鼠尿液中泛醌 Q2 含量明显下降,推测其能量代谢受到了影响,与肾病大鼠精神萎靡、体质下降、消瘦的症状吻合。

**3.7 磷脂代谢** 磷脂酰乙醇胺是哺乳动物组织中较重要的甘油磷脂,俗称脑磷脂,在脑组织中含量丰富,并在脑组织中发挥重要的生理功能。脑磷脂是脑细胞膜的重要组成部分,也是生命活动的主要结构基础,许多基本的生命过程,如脑中的能量转换、信息的识别和传递、脑细胞的发育和分化以及神经传导、激素的作用等,都与脑细胞膜有密切的关系。基于受损的肾小球滤过膜,尿液中磷脂酰乙醇胺含量显著升高。

另外,研究中发现造模大鼠连续给药 7 d,相比于给药前尿液代谢物谱继续偏离,未能及时回调,连续给药 14 d,代谢物谱显著回调,但仍未完全逆转。分析可能是造模对大鼠机能损伤过大,未能通过有效时间内给药达到完全逆转的效果。因此,考虑在后续实验中增加预保护组<sup>[20]</sup>,即在造模前给予雷公藤或雷公藤配伍甘草的提取物,从而减少对大鼠的损伤,更好的起到治疗作用,分析药物作用机制。

综上所述,本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术,

应用代谢组学方法对雷公藤配伍甘草给药后大鼠尿液内源性代谢产物进行研究,经PCA和OPLS-DA考察,筛选并鉴定出空白组与模型组间具有显著性差异的生物标记物29个。29个生物标记物中有14个受到雷公藤配伍甘草给药回调(11个被雷公藤单独给药回调),鉴定了TPW组和TPW-GLY组之间的差异代谢物7个,表明雷公藤配伍甘草可能改善了肾病综合征大鼠体内的氨基酸代谢、胆汁酸代谢、脂肪及脂肪酸代谢、能量代谢及嘌呤代谢等过程,从而改善了疾病状态,起到了减毒增效的作用。

[参考文献]

[1] BAO J, DAI S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: mechanism, efficacy, and safety [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(9): 1123-1129.

[2] LIN N, LIU C, XIAO C, et al. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(1): 136-146.

[3] 杨静娴, 韩国柱, 徐红, 等. 五子四物瓜石汤对抗雷公藤多苷所致消化系统毒性的研究[J]. *中药药理与临床*, 2002, 18(2): 35-37.

[4] SHEN G, ZHANG X, XIAO W, et al. Role of CYP3A in regulating hepatic clearance and hepatotoxicity of triptolide in rat liver microsomes and sandwich-cultured hepatocytes[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71: 90-96.

[5] 常立娟, 李佐静, 李清, 等. 雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 89-94.

[6] 李园丽, 覃筱芸. 雷公藤294例不良反应的文献调查与分析[J]. *山西医药杂志*, 2011, 40(1): 88-90.

[7] ZHOU J, XI C, WANG W, et al. Triptolide-induced oxidative stress involved with Nrf2 contribute to cardiomyocyte apoptosis through mitochondrial dependent pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(3):

454-466.

[8] ZHANG J, LIU L, MU X M, et al. Effect of triptolide on estradiol release from cultured rat granulosa cells [J]. *Endocr J*, 2012, 59(6): 473-481.

[9] 刘建群, 王卓, 徐金娣, 等. 甘草干预雷公藤内酯酮的代谢组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(19): 70-75.

[10] 夏素霞, 董晓茜, 杨瑞, 等. 雷公藤提取物与甘草提取物配伍对肾病模型大鼠血液学指标的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(10): 2282-2284.

[11] Egido J, Ortiz A, Gómez-Chiari M, et al. Involvement of lipid mediators in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats: its pharmacological modulation [J]. *Ren Fail*, 1991, 13(2/3): 95-101.

[12] Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management [J]. *Am Fam Phys*, 2009, 80(10): 1129-1134.

[13] 苏联麟, 李平, 程雪, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的醋制五味子对酒精性肝损伤大鼠胆汁代谢物的影响研究[J]. *中草药*, 2017, 48(1): 114-120.

[14] 郭鑫金. 血浆中烟酸、烟尿酸和烟酰胺的定量分析方法研究及其应用[D]. 大连: 大连医科大学, 2009.

[15] 杨聪娴. 重新探讨乳糜尿的发病机制[D]. 济南: 山东大学, 2008.

[16] 那彦群, 郭震华. 实用泌尿外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 587-588.

[17] Nishi S. Guidelines for the treatment of nephrotic syndrome [J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 2014, 56(4): 518-523.

[18] 江德文, 高丽真, 林从容, 等. 肾病综合症的尿酸代谢紊乱[J]. *临床荟萃*, 1995, 10(20): 935-936.

[19] 石艳丽. 血管紧张素转换酶抑制剂辅助激素对原发性肾病综合征的治疗效果[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(34): 97.

[20] 姜鹏. 麝香保心丸代谢组学和代谢动力学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.

[责任编辑 刘德文]