

· 药物代谢 ·

## 基于 UPLC/Q-TOF-MS 的“小儿腹泻外敷散” 敷脐治疗腹泻大鼠的尿液代谢组学

陈思伟, 陈云明, 刘莉\*, 刘强, 华何与, 张明慧, 张璐  
(南方医科大学 中医药学院, 广州 510515)

[摘要] **目的:**研究小儿腹泻外敷散对番泻叶所致腹泻大鼠尿液代谢组学的影响,确定标志物,阐明治疗机制。**方法:**以超高压液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UPLC/Q-TOF-MS)为核心技术,以主成分分析法(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)为数据解析手段,研究小儿腹泻外敷散对番泻叶所致腹泻大鼠的尿液中内源性代谢产物标志物的浓度影响。**结果:**各组之间样本点完全分离,各组内的样本有聚类作用,初步确定了6个生物标记物:马尿酸、柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、2-氨基苯甲酸、L-瓜氨酸、N-乙酰-5-羟色胺。小儿腹泻外敷散对6个生物标记物有明显的影响。**结论:**从生物体内代谢组学层面确定了小儿腹泻外敷散对番泻叶所致腹泻大鼠具有治疗作用,初步阐明了其治疗机制。

[关键词] 超高压液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱; 小儿腹泻外敷散; 代谢组学

[中图分类号] R285.5;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)21-0127-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1121.012.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:21

## Metabonomic Study on Urine of Diarrheal Rats Treated with Xiaoer Fuxie Waifu Powder Based on UPLC/Q-TOF-MS

CHEN Si-wei, CHEN Yun-ming, LIU Li\*, LIU Qiang, HUA He-yu, ZHANG Ming-hui, ZHANG Lu  
(College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xiaoer Fuxie Waifu powder on the urine of senna-induced diarrheal rats, identify the biomarkers, and explore its therapeutic mechanism. **Method:** Rat urine was collected and analyzed by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). The acquired data were analyzed using principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The concentration changes of endogenous metabolic biomarkers in the urine were studied. **Result:** Metabolite profiles of the urine samples among groups had been obviously classified. And samples showed clustering character in each group. Six metabolic biomarkers were tentatively identified as urobenzoic acid, citric acid,  $\alpha$ -oxoglutarate, 2-aminobenzoic acid, L-citrulline and N-acetyl-5-HTA, which could be obviously affected by Xiaoer Fuxie Waifu powder. **Conclusion:** The administration of Xiaoer Fuxie Waifu powder could affect endogenous metabolites of urine, which may be its therapeutic mechanism.

[Key words] ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry; Xiaoer Fuxie Waifu powder; metabonomics

[收稿日期] 20131217(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102823);国家级大学生创新创业训练计划(201312121036)

[第一作者] 陈思伟,从事制剂学研究,E-mail:sysLL@fimmu.com

[通讯作者] \*刘莉,博士,副教授,从事中药外用制剂的研究与开发,Tel:13430359298,E-mail:shyshLL@163.com

中药敷脐疗法是一种颇具中华民族医药特色的外治疗法。它是将中药制成适宜剂型敷于脐部,通过脐部刺激和药物作用共同达到治病效果的一种穴位给药方法。脐疗发挥的是机体整体的调节作用,对其系统生物学的研究需要借助现代医药技术手段,以反映生物体在治疗干预下的生理和生化状态随时空变化的情况,整体表征脐疗的作用特点。代谢组学的引入,对于从宏观代谢网络体系研究穴位和药物对机体的作用机制具有重要的意义。“小儿腹泻外敷散”收载于《中国药典》<sup>[1]</sup>,由丁香、肉桂、吴茱萸、胡椒组成,具有温中散寒、止痛止泻之功,外敷脐部,用于小儿脾胃虚寒所致泄泻。文章通过研究“小儿腹泻外敷散”敷脐治疗番泻叶所致腹泻大鼠尿液中内源性代谢物产物及其标志物的变化,揭示脐疗透皮给药治疗腹泻的机制。

### 1 材料和方法

**1.1 仪器、试剂和动物** 超高压液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱 (UPLC/Q-TOF-MS) (Waters 公司), ACQUITY UPLC C<sub>18</sub> 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 低温高速离心机 (德国 Beckman 公司), 超低温冰箱 (-80 °C, Thermo 公司)。

甲酸 (色谱纯, TEDIA 公司), 甲醇和乙腈 (色谱纯, Merck 公司)。

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 3 ~ 4 周龄, 南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (粤) 2011-0015。

**1.2 小儿腹泻外敷散的组成及制备** “小儿腹泻外敷散”贴敷剂: 吴茱萸 9 份、胡椒 6 份、丁香 6 份、肉桂 6 份、粉碎成细粉, 混匀, 临用前取药粉 0.4 g, 以食醋 10 mL 调和成直径 1 cm 大小的药饼。

**1.3 样品采集与制备** 室温 (25 ± 2) °C, 湿度 (50% ± 10%), 通风良好, 大鼠于室内保持 12 h 光照, 12 h 避光循环饲养, 并保持给予标准饲料和饮用水, 单笼饲养, 在代谢笼中适应 5 d, 先用 20% 的番泻叶水煎液灌胃, 剂量 0.02 mL · g<sup>-1</sup>, 4 d 后造成虚泻模型, 计算腹泻指数, 提示造模成功, 将造模成功的大鼠随机分成 3 组: 腹泻模型组、脐部给药组、非脐部给药组 (背部), 另有空白组, 以上 4 组, 每组 10 只。脐部给药在第 1 次给药前 24 h 在其脐部 (神厥穴, 在大鼠的腹正中线上, 以剑突为一定位点, 以耻骨联合上缘为另一定位点, 两者连线的上 2/3 与下 1/3 的交点定位为“神厥穴”<sup>[2]</sup>) 做直径 3 cm 脱毛, 非脐部给药在其背部做直径 3 cm 脱毛, 给药时在暴露处予小儿腹泻外敷散粉外敷。使用方法: 取

药饼 1 个, 用胶布贴于暴露处, 各组连续敷药 5 d, 每天 1 次, 每次贴药 12 h。

从给药后开始每天收集 12 h 尿液, 停药后继续收集 12 h 尿液至第 2 天。合并每只大鼠收集的尿液, 5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 0.5 mL, 加甲醇 1 mL, 涡旋混合, 5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 供 UPLC/Q-TOF-MS 分析。

### 1.4 分析条件

**1.4.1 色谱条件** ACQUITY UPLC C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 流动相 A-0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B-0.1% 甲酸乙腈溶液, 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 超高压液相色谱的梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0	95	5	11	0	100
2	95	5	13	0	100
8	40	60	15	95	5
8.5	18	82	17	95	5
10.5	18	82			

**1.4.2 质谱条件** 质谱仪器为 Waters 超高压液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱 (UPLC/Q-TOF-MS), 采用电喷雾离子源正离子模式检测; 脱溶剂气和雾化气流量分别为 600, 100 L · h<sup>-1</sup>, 脱溶剂气温度为 350 °C, 离子源温度为 120 °C, 毛细管电压和锥孔电压分别 3 200, 30 V。每 0.15 s 采集 1 次谱图, 质量扫描范围 m/z 100 ~ 900。

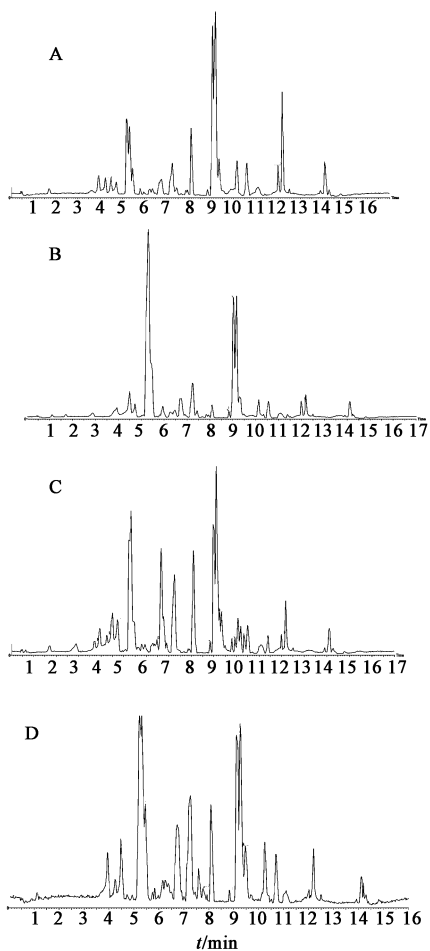
**1.5 数据处理** 采用 Markerlynx Version 4.1 (Waters Manchester, UK) 软件进行色谱峰识别以及峰匹配, 然后将数据导入 SIMCA-P (Umetrics) 软件, 采用主成分分析法 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 对各组大鼠尿液的代谢组进行分析。主成分分析法是将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的一种多元统计分析方法, 各个样品在各个主成分的得分就是其在计算的数学模型中的空间坐标, 结果包括散点分布图 (Scores plot) 和荷载图 (Loadings plot)。Scores plot 图反映组间离散程度, 可观察样品的聚集、离散程度。样品分布点越靠近, 说明这些样品中所含有的变量/分子的组成和浓度越接近; 反之, 样品点越远离, 其差异越大。Loadings plot 图标示离子对离散趋势贡献程度, 表示了所检测的变量 (MS 中色谱峰) 分布情况<sup>[3]</sup>。PLS-DA 为监督模式识别方法, PLS-DA 模型是通过拟合, 根据模式识别模型抽提出对分类有重要贡献

的化合物后,进一步验证这些化合物的差异性。

**1.6 标志物的鉴定** 生物体液代谢物谱的改变常常表现在某些标志代谢物的含量变化上,通过多元统计分析中变量的载荷大小寻找生物标志物是常用方法,载荷越大说明对样本点分类的贡献也越大,变量重要性投影(variable important in the projection, VIP)是一种改进的变量载荷评价参数,可以作为评价潜在标志物的参数。根据 loading plot 图,对分组贡献较大(VIP)的代谢物进行提取。根据提取后代谢物的相对分子质量( $m/z$ )在 HMDB<sup>[4]</sup>, METLIN<sup>[5]</sup> and KEGG<sup>[6]</sup> 数据库进行比对<sup>[7-8]</sup>。然后再对这些物质进行串联质谱(MS/MS)分析。并与数据库、参考文献、对照品的 MS/MS 图对比,鉴定出生物标志物。

## 2 结果

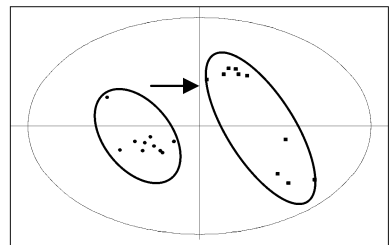
**2.1 各实验组动物尿液的 UPLC/Q-TOF-MS 色谱图** 见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,各组分达到了较好的分离,各组图谱间存在较大差异。



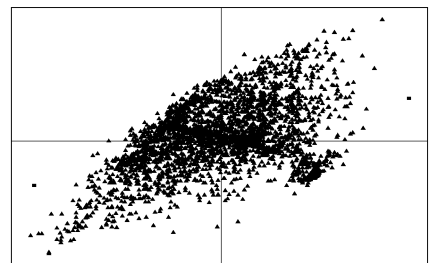
A. 空白组; B. 模型组; C. 脐部治疗组; D. 非脐部治疗组  
图 1 各实验组动物尿液的 UPLC-Q-TOF 总离子流

**2.2 正常组与腹泻模型组大鼠代谢物谱差异** 正

常组与腹泻模型组大鼠代谢物散点分布图(Scores plot)和荷载图(Loadings plot)见图 2,3。由图 2 可知,在 Scores plot 中,空白组与模型组能够完全区分,且分别具有一定的聚类作用,模型组内呈一定的散发分布,反应出其组内差异较大。从总体趋势来说,模型组大鼠的代谢特征,有逐渐向右侧运动的趋势。模型的解释率和预测率为  $R^2 Y_{cum} = 0.991$ ,  $Q^2 Y = 0.725$ 。



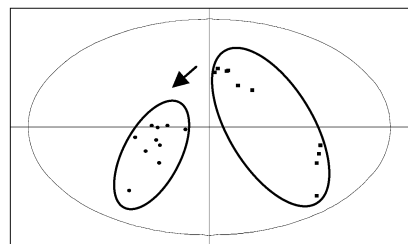
●. 空白组; ■. 模型组; →. 模型组运动趋势  
图 2 空白组与模型组的对比散点分布



▲. 空白组; ■. 模型组  
图 3 空白组与模型组对比的荷载

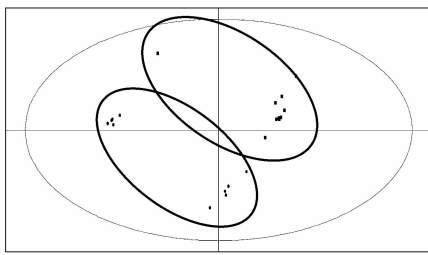
**2.3 标志物的鉴定** 结合图 3、VIP 值及 MS-MS 串联质谱,分析鉴定出 6 种生物标志物,见表 2。

**2.4 脐疗的介入治疗效果** 模型组与脐部治疗组,模型组与非脐部治疗组的散点分布图(scores plot)见图 4,5。各组之间生物标志物相对含量的变化见表 2。



●. 脐部治疗组; ■. 模型组; →. 给药组运动趋势  
图 4 模型组与脐部给药组对比的散点分布

由图 4 可知,在 scores plot 中,模型组与脐部给药组点分离,分别具有一定的聚类作用,脐部治疗组的点已回归正常样本点所在区域,证明脐疗治疗组对腹泻大鼠的生理及代谢状况产生有效的干预作



●. 非脐部给药组; ■. 模型组

图 5 模型组与非脐部给药组对比的散点分布

表 2 大鼠尿液中生物标记物相对含量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

代谢物	$t_R/\text{min}$	$m/z$	VIP	生物学途径	空白组	模型组	脐疗
马尿酸	4.91	178.16	2.681	肠道生物群	1.402 ± 0.012	1.910 ± 0.145 <sup>1)</sup>	1.465 ± 0.152 <sup>2)</sup>
柠檬酸	6.90	192.14	2.673	三羧酸循环	1.337 ± 0.147	1.085 ± 0.148 <sup>1)</sup>	1.282 ± 0.098 <sup>2)</sup>
α-酮戊二酸	4.79	146.11	2.422	三羧酸循环	1.617 ± 0.245	1.361 ± 0.149 <sup>1)</sup>	1.532 ± 0.141 <sup>2)</sup>
2-氨基苯甲酸	5.86	137.05	2.392	色氨酸代谢	1.453 ± 0.289	1.641 ± 0.021 <sup>1)</sup>	1.446 ± 0.108 <sup>2)</sup>
L-瓜氨酸	7.92	175.19	2.024	精氨酸代谢	1.136 ± 0.477	0.913 ± 0.012 <sup>1)</sup>	1.125 ± 0.177 <sup>2)</sup>
N-乙酰-5-羟色胺	9.12	219.14	1.681	色氨酸代谢	1.543 ± 0.144	1.802 ± 0.103 <sup>1)</sup>	1.455 ± 0.156 <sup>2)</sup>

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

模型组中与三羧酸循环(TCA)相关的代谢产物柠檬酸、α-酮戊二酸水平下降,TCA为糖、脂肪酸、某些氨基酸等物质的合成代谢提供小分子前体,其改变与能量代谢密切相关,还与脂肪、葡萄糖和蛋白质的代谢紊乱有密切关系<sup>[10]</sup>。证明在此过程中,TCA循环加快,各种反应物和产物过度消耗。小儿腹泻外敷散则可以调节能量代谢,使其恢复正常<sup>[11]</sup>。2-氨基苯甲酸和N-乙酰-5-羟色胺直接或间接参与了5-羟色胺(5-HT)的代谢。5-HT是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质和旁分泌信号分子,与胃肠道的活动密切相关,5-HT与其受体结合后可以作用于平滑肌,或者通过肠神经纤维影响胃肠动力。比较治疗前后两种标志物的相对含量变化。证明脐疗可显著降低5-HT的含量,有利于舒张平滑肌,减少收缩和分泌,从而发挥治疗腹泻的作用。L-瓜氨酸参与了精氨酸的代谢。精氨酸在体内会被氧化为N-羟基-精氨酸,再行氧化成瓜氨酸并释出一氧化氮(NO)。NO是胃肠道非肾上腺非胆碱能(NANC)神经释放的主要抑制性神经递质,能消除胃肠道持续收缩,对胃肠道平滑肌有一定调节作用,同时还影响胃酸、胃蛋白酶等黏膜损伤和保护因子的分泌。脐疗可以影响色氨酸的代谢,从而干预NO的合成,增加其含量,治疗腹泻<sup>[12]</sup>。

### 3 讨论

#### 3.1 造模方法 小儿腹泻外敷散中所含药物均为

用。由图5可知,在scores plot中,模型组与非脐部给药组点未分离,部分重合。非脐部给药组亦无聚类作用。证明非脐部给药未达到干预效果。

由表2可知,确定了6种标志物,分别为马尿酸、柠檬酸、α-酮戊二酸、2-氨基苯甲酸、L-瓜氨酸、N-乙酰-5-羟色胺。马尿酸为肠道微生物代谢的主要产物,其变化表明小儿腹泻外敷散对肠道微生态具有调节作用,可纠正肠道菌群失衡<sup>[9]</sup>。脾虚时机体能量代谢降低,出现倦怠,神疲少力,腹泻等症状,

温里药,用于脾胃虚寒,运化失调所致之“寒泻”,“虚泻”。番泻叶作为大肠的缓泻剂,其所致腹泻缓和,粪便稀溏而无异臭,近似“寒泻”、“虚泻”。故用此泄泻模型,可以观察到温里方药的“温中止泻”功效<sup>[13]</sup>。参照《药理实验方法学》<sup>[13]</sup>,腹泻的主要评价指标采用腹泻指数来评定。腹泻指数=稀便率与稀便级的乘积。其中稀便率为每只动物所排的稀便数与总便数之比。稀便级为表示稀便的程度。以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级分为4级,标准:级数(污染直径cm):1(<1);2(1~1.9);3(2~3);4(>3)。统计时先逐个统一每1堆稀便的级数,然后将该鼠所有稀便级数相加除以稀便次数得稀便的平均级数。腹泻率:一组动物中排稀便的动物数与该组动物总数的百分比。判断标准:①造型成功的标准:造模组与对照组比较,腹泻率及腹泻指数有差异。②治疗有效的标准:给药组与对照组比较,腹泻指数降低等有统计学意义。

#### 3.2 尿液处理方法和分析方法的选择

尿液中的成分主要是极性低相对分子质量代谢物,同时含有少量的各种细胞、微量的大分子物质及磷酸盐、硫酸盐等各种盐类物质,这些都有可能对UPLC/Q-TOF-MS分析产生一定的影响<sup>[14]</sup>。实验比较了直接微孔滤膜过滤法<sup>[15]</sup>,蒸馏水稀释法<sup>[16-17]</sup>,甲醇稀释法<sup>[18]</sup>,固相萃取法处理后<sup>[19]</sup>的尿液样品检测信息量和基质效应,最终确定样品的处理方式为尿液用甲醇(1:2,体

积比)进行稀释,离心沉降,过微孔滤膜。

尿液为复杂生物样本,选择梯度洗脱能够达到较好的分离效果,质谱条件中,脱溶剂气流量及温度对代谢物的离子化效果影响较大<sup>[20]</sup>,因此在检测条件中主要优化了这两个参数。

**3.3 结果与讨论** Scores plot图显示,动物造模成功,且脐疗对腹泻大鼠具有干预作用,其效果明显好于非脐疗组。通过对生物标志物相对含量变化的研究表明,小儿腹泻外敷散对腹泻大鼠的干预机制主要是调节机体肠道生物群代谢、三羧酸循环、色氨酸代谢和精氨酸代谢,使大鼠能量代谢,肠道代谢和主要神经递质水平恢复正常,从而达到治疗效果。

实验从生物体内代谢组学层面确定了小儿腹泻外敷散敷脐对番泻叶所致腹泻大鼠具有明显治疗作用,并初步阐明了其治疗机制。实验结果将为采用系统生物学的方法整体表征脐疗作用特点,反映生物体在治疗干预下的生理和生化状态随时空变化的情况提供研究依据。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:501.

[2] Govorukhina N I, Reijmers T H, Nyangoma S O, et al. Analysis of human serum by liquid chromatography-mass spectrometry: improved sample preparation and data analysis [J]. J Chromatogr A, 2006, 1120 (1/2):142.

[3] 王海军,冀来喜. 关于大鼠“神阙”穴的定位[J]. 针刺研究,2007,32(5):312.

[4] Wishart D S, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the human metabolome database[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35 (9):D521.

[5] Smith C A. METLIN; a metabolite mass spectral database [J]. Ther Drug Monit, 2005,27(3):747.

[6] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28 (1):27.

[7] 黄欣,龚益飞,王毅,等. 代谢组学方法研究水飞蓟宾对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 高等学校化学学报,2008,29(4):714.

[8] 黄海军. 肝病患者粪便上清代谢组学研究及肠道菌

群对代谢的影响[D]. 杭州:浙江大学医学院,2010.

[9] 尤蓉,庞启华,徐振波,等. 肠道微生物作用的代谢组学研究及对中药作用机制研究的启示[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(6):229.

[10] 王伟明,黄育华,熊振芳,等. 肝气郁结证大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2010,20(2):102.

[11] 邹忠杰,施旭光,龚梦娟,等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(3):291.

[12] 王晓翠. 隔药灸脐法治疗脾虚型肠易激综合征的代谢组学研究[D]. 济南:山东中医药大学,2012.

[13] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:1124.

[14] 邹忠杰,梁生旺,袁经权. 中药代谢组学研究中生物样品前处理方法[J]. 广东药学院学报,2010,26(4):434.

[15] Waybright T J, Van Q N, Muschik G M, et al. LCMS in metabolomics; optimization of experimental conditions for the analysis of metabolites in human urine [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2006, 29 (17/20):2475.

[16] Zhao X, Zhang Y, Meng X, et al. Effect of a traditional Chinese medicine preparation Xindi softcapsule on rat model of acute blood stasis: a urinary metabolomics study based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2008, 873(2):151.

[17] Gir I S, Krausz K W, Idle J R, et al. The metabolomics of (+/-)-arecoline 1-oxide in the mouse and its formation by human flavin-containing monooxygenases [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(4):561.

[18] Wong M C Y, Leea W T K, Wong J S Y, et al. An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabolomic research using UPLC/Q-TOF-MS [J]. J Chromatogr B, 2008, 871(2):341.

[19] 陈艳华,张瑞萍,宋咏梅,等. 基于快速高分辨液相色谱串联质谱技术的代谢组学尿液分析方法的建立[J]. 分析化学,2011,39(2):173.

[20] 王喜军,刘莲,孙晖,等. 乙醇诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究[J]. 中国药理学通报,2008,24(4):452.

[责任编辑 邹晓翠]