

· 药物代谢 ·

## 左归丸对大鼠血清代谢物质组影响的研究

王颖莉, 李亚妮, 许凯霞, 冯前进\*  
(山西中医学院, 太原 030024)

**[摘要]** 目的:分析左归丸含药血清物质组的代谢特征。方法:采用核磁共振技术(NMR)获得左归丸大鼠含药血清样本中代谢物指纹图谱的数据,应用正交偏最小二乘判别分析法研究左归丸含药血清与空白血清之间的代谢物谱差异,通过变量重要性投影(VIP)和 $t$ 检验在血清中发现潜在生物代谢物。结果:给左归丸药物后大鼠血清中的丙酮酸,乳酸,低密度脂蛋白和乙酸乙酯等物质对比空白血清有显著差异。结论:给左归丸药物后大鼠血清中的丙酮酸,乳酸,低密度脂蛋白和乙酸乙酯等物质的变化,可使能量代谢途径发生变化,并引起机体代谢机能提高。

**[关键词]** 左归丸; $^1\text{H-NMR}$ ; 正交偏最小二乘法-判别分析; 代谢组学

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0121-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230121

## Studies on Metabolic Substances of Zuogui Wan in Serum of Rats

WANG Ying-li, LI Ya-ni, XU Kai-xia, FENG Qian-jin\*  
(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the metabolic characteristics of Zuogui Wan in serum of rats. **Method:** The technology of nuclear magnetic resonance (NMR) was used to get metabolite fingerprint data of Zuogui Wan in serum, and the orthogonal partial least-squares discriminant analysis method was used to study the difference of the metabolite profile between Zuogui Wan containing serum and blank serum, then the variable importance in projection (VIP) and  $t$  test was to show the potential biological metabolites in serum. **Result:** There were significant differences in the pyruvate, lactic acid, low density lipoprotein and ethyl acetate and other material between Zuogui wan containing serum and blank serum. **Conclusion:** The variation of pyruvate, lactic acid, low density lipoprotein and ethyl acetate and other material in rats after giving Zuogui Wan containing serum can change the energy metabolism and cause the improvement of metabolism function.

**[Key words]** Zuogui Wan;  $^1\text{H-NMR}$ ; orthogonal partial least squares and discriminant analysis; metabonomics

左归丸出自《景岳全书》卷五十一新方八阵方<sup>[1]</sup>。可滋阴补肾,填精益髓。主治真阴不足证。头晕目眩,腰酸腿软,遗精滑泄,自汗盗汗,口燥舌干,舌红少苔,脉细。其处方由熟地黄、山药(炒)、枸杞子、山茱萸、川牛膝、鹿角胶、龟板胶和菟丝子组成。

左归丸含药血清对体外分离、培养的成骨细胞

分泌骨钙素有显著影响,对成骨细胞的骨形成有促进作用,同时,对破骨细胞有直接的抑制作用,且可通过成骨细胞间接对破骨细胞产生抑制作用,是其防治骨质疏松症的机制之一<sup>[2-3]</sup>。进一步对具有专一定向成骨细胞分化特性的成骨前体细胞系MC3T3-E1 Subclone14的研究结果还表明,左归丸含药血清可能是通过发挥雌激素样作用调控了ERK/

**[收稿日期]** 20140219(011)

**[基金项目]** 国家国际科技合作专项项目(2012DFA31330)

**[第一作者]** 王颖莉,博士,副教授,E-mail: wylyut@163.com

**[通讯作者]** \*冯前进,教授,从事方药的物质基础研究,Tel: 0351-2272278,E-mail: xyqj728119@sina.com

Smads 信号通路,从而有效地促进成骨细胞增殖和分化,以达到防治骨质疏松的目的<sup>[4]</sup>。这一作用机制为中医“肾主骨”理论提供了实验依据。

左归丸含药血清能够促使骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶表达。而碱性磷酸酶是成骨细胞的一种细胞表面标志性酶,随着成骨分化程度的增加,碱性磷酸酶表达增强<sup>[5]</sup>。左归丸含药血清也可明显提高骨髓间质细胞向肝细胞的转化率,对骨髓细胞向肝细胞的分化具有促进作用,为骨髓转化为肝细胞的“横向分化”理论提供新的实验依据<sup>[6]</sup>。

左归丸含药血清具有多靶点作用的特点,含药血清成分复杂。将左归丸含药血清作为一个化学物质系统,采用高通量的、重复性好的核磁共振(NMR)技术分析检测大鼠血清代谢物组,结合正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS)等数据分析技术,阐述这个物质系统对于特定生物机体所产生的整体影响,为建立左归丸含药血清科学性评价系统奠定基础。

## 1 材料

**1.1 药材与试剂** 熟地黄、山药、鹿角胶、龟板胶(产地河南),枸杞子(产地宁夏),菟丝子(产地内蒙),川牛膝(产地四川),山茱萸(产地浙江),以上中药均购于同仁堂药店。按左归丸处方量称取熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子,加 8 倍量水煎煮 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,取龟板胶、鹿角胶加适量水加热溶解,待胶类全部溶解后置于煎煮好的药液中,加热浓缩。氘水(D<sub>2</sub>O,99.9%,美国 Sigma 公司),2,2',3,3'-三甲基甲硅烷基丙酸(TSP,美国 Aldrich 公司),乙醚(安徽金邦化工有限公司,批号 120805)。

**1.2 仪器** 600-MHz AVANCE III NMR spectrometer(600.13 MHz proton frequency,德国布鲁克公司 600 兆核磁仪),GL-21C 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),KDC-1044 离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),超低温冰箱(美国生命科学公司)等。

**1.3 动物** 雄性 SD 成熟大鼠,体重(220±20)g,均为清洁级动物,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK-(军)2007-004KM。

## 2 方法

**2.1 血清样品的制备** 将大鼠正常饲养 3 d,分为左归丸给药组(A组)和空白组(B组)。次日称重并根据体重按生药材量 20 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 给药量分别

给予给药组左归丸水提液,空白组给予等量的蒸馏水。连续给药 7 d,每天 2 次,每日给药前称重,严格控制给药量。6 d 灌胃完成后开始禁食 12 h,第 7 天灌胃后开始计时,30 min 内进行眼眶取血。待取血完成后,将血液在 -4℃ 放置 30 min,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,收集血清存放于 -70℃ 冰箱待用。

**2.2 血清样品的预处理** 血清常温解冻,14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 除少量蛋白,取 0.4 mL 样品血清于离心管中,加入 0.2 mL 缓冲溶液(0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)及 0.06 mL D<sub>2</sub>O,于 4℃ 下静置 10 min,以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取 0.55 mL 上清液于 5 mm NMR 样品管中,25℃ 下进行测试<sup>[7]</sup>。

**2.3 <sup>1</sup>H-NMR 谱数据采集与分析** 样品采用预饱和方法压制水峰,血清采用 CPMG 自旋回波序列结合预饱和方法采集信号,FID 采样次数 32,数据点 32 k,延迟时间 10 s,采样时间均为 2.72 s,谱宽 12 019.230 Hz。

NMR 数据用软件 MestReNova (version 5.2.5, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 对所获谱图进行手动相位和基线校正后,参照 TSP (δ 0.00) 对<sup>1</sup>H-NMR 谱的化学位移进行定标。在 δ 0.54~10.02 区域按 80.04 等间隔分段积分,去除包含水峰的区间 4.7~5.2,将积分按每张谱的总积分面积归一化,所得数据转换成 ASC II 文件输出到 Excel 2007 中,用于模式识别分析。

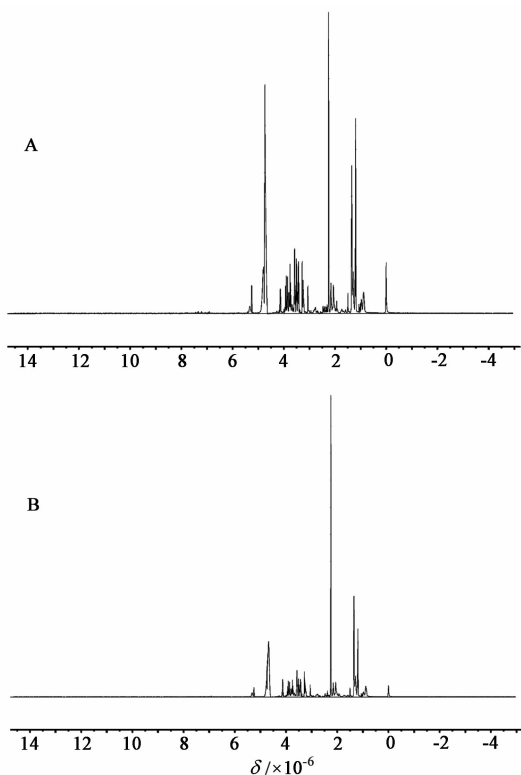
**2.4 数据处理** 所得数据导入 SIMCA-P 11.5 (瑞典 Umetrics 公司)进行多元统计分析。首先利用主成分分析(PCA),获得总数据的可视化总览,观察样本群是否都位于 95% 置信区间内。采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。交叉分析所获得的参数模型回归程度 R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y 和模型预测能力 Q<sup>2</sup> 指标。

差异标志物提取,变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)大于 1 的变量的代谢物用 *t* 检验对筛选到的差异变量在空有血清组和含药血清间进行验证,只有 *P* < 0.05 的差异变量做为是潜在的生物标志物进行解析,解释左归丸对大鼠的整体性响应特征。

## 3 结果

**3.1 血清样本的<sup>1</sup>H-NMR 代谢物谱分析** 空白血清与左归丸血清代表样本的<sup>1</sup>H-NMR 分析结果如图 1 所示。

从图 1 看出,血清中含氢代谢物中的氢化学位



A. 左归丸组大鼠含药血清样本, 给药剂量  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  
B. 空白组大鼠血清样本, 给予蒸馏水

图1 空白血清与左归丸血清样本的  $600 \text{ M } ^1\text{H-NMR}$

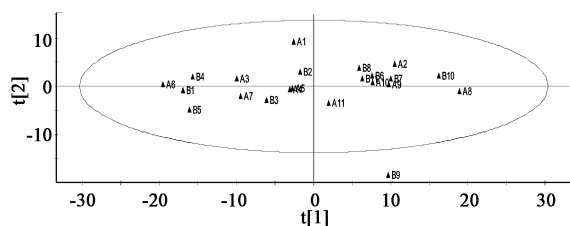
移非常复杂,主要是依据化学位移值、峰的裂分情况及参考文献报道<sup>[8-9]</sup>,共识别出10种代谢物,主要是氨基酸、有机酸及葡萄糖等(表1)。在化学位移区间  $0.7 \sim 2.0$ ,存在许多含有  $\text{C-CH}_3$  甲基基团的代谢物,如氨基酸、有机酸、脂蛋白、糖蛋白等。而在化学位移区间  $\delta 2.1 \sim 4.0$ ,为有机酸、氨基酸等的亚甲基基团以及  $\text{N-CH}_3$  基团。这些物质为大鼠血清中内源性代谢物组整体,表明 $^1\text{H-NMR}$ 能够一次性高通量地对这些物质同时进行分析。两组大鼠血清样本中的小分子代谢物组成基本相同,但两组血清样本之间代谢物的比例存在差异,说明每个血清样本的代谢谱图描述了各自样本的生理生化状态,还需要对这些图谱进行数据处理以提取有效的标志物。

**3.2 左归丸组与空白组大鼠血清代谢物谱差异** 将经过预处理的 NMR 数据,采用 PCA 法研究血清代谢物谱模式变化,获得两组大鼠血清样本在空间上的分布情况,如图2。PCA 结果表明,两组血清样本除 B9 样品外,都分布在置信区间(95%)内。两组样本并没有明显分离,这与 PCA 是无监督的模式识别分析技术,PCA 反映了数据的原始状态,用来观察样品的原始自然分布和组别关系。

表1 大鼠血清中识别的代谢物

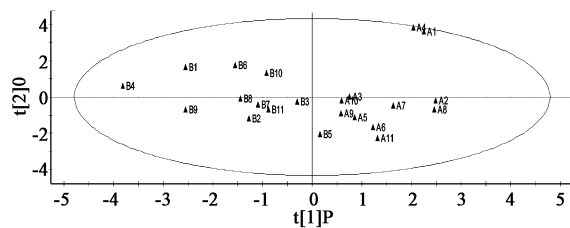
Metabolites	$\delta^1 \text{H}$	Metabolites	$\delta^1 \text{H}$
脂蛋白	0.890(m);1.300(m)	糖蛋白	2.069(m)
缬氨酸	1.060(d)	乙酰乙酸	2.247(s)
3-羟基丁酸	1.210(d)	丙酮酸	2.391(s)
乳酸	1.340(d);4.130(q)	肌酸	3.050(s)
丙氨酸	1.480(d)	胆碱	3.219(s)

注:s,单峰;d,双重峰,t,三重峰;m,多重峰。



A. 左归丸组大鼠含药血清样本;B. 空白组大鼠血清样本  
图2 左归丸组和空白组大鼠血清 PCA 分析得分图

为消除与研究目的无关的随机误差及组内误差,采用有监督的 OPLS-DA 方法进行分析。OPLS-DA 是一种改进的 PLS-DA 方法,可滤除了自变量矩阵(X)中与因变量矩阵(Y)无关的信息,从而提高判别分析的能力,使两组分类的差别达到最大,有助于确定两组之间的差异成分,从而识别有效的标志物。左归丸组和空白组大鼠血清样本 OPLS-DA 得分图如图3所示。



A. 左归丸组大鼠含药血清样本;B. 空白组大鼠血清样本  
图3 左归丸组和空白组大鼠血清 OPLS-DA 分析得分图

经由交叉验证获得各个模型的特征参数  $R^2 X$ ,  $R^2 Y$  和  $Q^2$  为 0.239,0.221 和 0.117。图3与图2相比,左归丸组与空白大鼠血清得到了最大程度的分离,有助于寻找差异成分。

**3.3 差异生物标志物提取和解析** 使用 OPLS-DA 模型中 VIP 参数评价潜在的生物标志物。选取  $\text{VIP} > 1$  的差异变量,根据载荷分布确定变化方向,再用  $t$  检验对筛选到的差异变量在空白对照组和左归丸组间进行验证, $P < 0.05$  的差异变量认为是潜在的生物标志物。按照上述原则,最终在血清筛选得到具有显著差异的化合物,见表2。

表 2 左归丸组和空白组大鼠血清的差异生物代谢物( $\bar{x} \pm s$ )

代谢物	$\delta^1\text{H}$	VIP	空白组	左归丸血清组
丙酮酸	2.391	10.339 7	4.779 $\pm$ 1.200	6.807 $\pm$ 2.657 <sup>1)</sup>
乳酸	1.340	5.705 93	6.364 $\pm$ 0.879	7.581 $\pm$ 0.608 <sup>2)</sup>
3-羟基丁酸	1.210	4.812 28	4.935 $\pm$ 0.944	4.413 $\pm$ 0.735
脂蛋白	1.300	3.495 92	6.347 $\pm$ 1.071	5.602 $\pm$ 1.163
低密度脂蛋白	0.890	2.991 89	3.688 $\pm$ 0.600	2.871 $\pm$ 0.427 <sup>2)</sup>
胆碱	3.219	1.293 59	1.728 $\pm$ 0.538	1.916 $\pm$ 0.320
乙酰乙酸	2.247	1.060 63	0.650 $\pm$ 0.194	0.422 $\pm$ 0.198 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 结论

经过 7 d 的灌药后,大鼠机体在各种刺激因素影响下会启动自身的补偿调节机制,从各种刺激导致机体的扰动中恢复平衡,使得大鼠血清代谢物整体变化不明显系统内重新建立了新的平衡状态。这种平衡状态的变化表明,左归丸这种复杂物质的体系对大鼠机体血清中生化途径代谢通路产生了影响。分析引起变化的小分子代谢物,就有可能解析左归丸在大鼠体内的作用机制。

大鼠灌胃左归丸后,乳酸水平升高,表明左归丸影响了大鼠体内能量代谢过程。左归丸中的山茱萸含有没食子酸<sup>[10]</sup>等抗氧化物质,这些物质通过抑制有氧化代谢减少自由基的产生,从而使得血清中乳酸浓度升高。同时,左归丸中的山茱萸含有莫诺普、马钱子苷等环烯醚萜苷<sup>[11]</sup>,可增加 SOD 活性增加,有利于机体将过多的自由基转变成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再在谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶的作用下将转变成 H<sub>2</sub>O。表明左归丸的抗氧化物质、环烯醚萜苷可抑制有氧化代谢,从而使得大鼠体内能量代谢途径发生变化。

丙酮酸水平的上升表明左归丸摄入可引起机体代谢机能提高。丙酮酸是体内产生的三碳酮酸,它在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用。研究表明,长期外源性地补充丙酮酸可明显控制大鼠体重增长速度,明显提高血清游离脂肪酸浓度,明显降低血清总胆固醇(TC)浓度,其机制可能是通过促进机体对糖的吸收与利用从而促进糖代谢、加快脂肪酸动员和脂肪酸利用,使机体能量代谢水平提高而发挥作用<sup>[12]</sup>。此外,它还可降低甘油三酯(TG)含量、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量<sup>[13]</sup>。从本研究结果推测,左归丸摄入可能会起到类似外源性补充丙酮酸的作用,从而可以间接起到以上一系列作用。

从本研究结果可以看出,左归丸摄入有降低大鼠机体 LDL 的作用,从而推测其可以进一步降低其发生动脉硬化及由其引起的一系列疾病的风险。由上述分析还可以推测,LDL 的降低有可能与摄入左归丸引起的丙酮酸的增加有关。

本研究显示,大鼠摄入左归丸后其血清中乙酰乙酸的含量下降。可推测,左归丸通过一些途径可能有减少脂肪酸代谢或增强肝外组织氧化利用酮体能力的作用。又从上述丙酮酸的增加可提高血清游离脂肪酸浓度分析,左归丸很可能通过增强肝外组织氧化利用酮体能力的角度,从而有降低血清中乙酰乙酸的作用。这也意味着服用左归丸后,机体能量代谢可增强,并且预防各种原因引起的酮症酸中毒的能力也增强。具体还有待于进一步验证。

#### [参考文献]

[1] 孙琳林,康广盛,韩海荣,等. 左归丸实验研究概况[J]. 中成药, 2010, 32(3):477.

[2] 刘梅洁,吕国红,邹军,等. 左归丸含药血清对成骨细胞分泌骨钙素的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(8):581.

[3] 赵宏艳,鞠大宏,刘梅洁,等. 左归丸含药血清对破骨细胞骨吸收功能的影响以及成骨细胞对其的介导作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(9):662.

[4] 蒿长英,任艳玲,赵金茹. 左归丸含药血清通过 ERK/Smads 信号通路干预 MC3T3-E1 细胞的功能基因表达[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6):872.

[5] 徐凌霄,高俊,张前德. 左归丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):149.

[6] 李瀚旻,晏雪生,罗建君,等. 左归丸药物血清对骨髓间质细胞转化为肝细胞的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(28):5465.

# HPLC-FD 测定大鼠尿液中儿茶酚胺类化合物

夏国华<sup>1</sup>, 李子豪<sup>1</sup>, 陈晨<sup>2</sup>, 陈钧<sup>1</sup>, 杨欢<sup>1\*</sup>, 贾晓斌<sup>1,3\*</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏大学京江学院, 江苏镇江 212013;  
3. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC-FD 测定大鼠尿液中儿茶酚胺类化合物 (CAs) 的含量, 为虚热证的药理学研究提供参考。方法: 采用酸性氧化铝吸附法制备大鼠尿样; 使用 HiQSil C<sub>18</sub> V 色谱柱, 流动相 0.02 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 激发波长 (E<sub>x</sub>) 280 nm, 发射波长 (E<sub>m</sub>) 316 nm, 柱温 40 °C。结果: 大鼠尿样供试液中的儿茶酚胺类化合物可以与各干扰组分达到基线分离; CAs 各组分线性、精密度和重复性良好; 该法制备的样品溶液在 16 h 内测定, RSD < 2%; CAs 的回收率在 65% ~ 71%, 试验中测得适应期后大鼠尿液中 CAs 含量稳定。结论: 该文采用的供试品溶液制备方法简便, 建立的色谱分析方法稳定、可靠, 适合于大鼠尿液中 CAs 的含量测定。

**[关键词]** 儿茶酚胺; 酸性氧化铝吸附法; 荧光高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1; R946 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0125-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230125

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1537.016.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-27 15:37

## Determination of Catecholamines Excretion in Rats Urinary by HPLC-FD

XIA Guo-hua<sup>1</sup>, LI Zi-hao<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup>, CHEN Jun<sup>1</sup>, YANG Huan<sup>1\*</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu University Jingjiang College, Zhenjiang 212013, China;

3. Key Laboratory of Chinese Medicine Delivery System in State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[收稿日期]** 20140705(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81303174); 江苏省自然科学基金项目(BK2012290); 江苏省大学生创新创业训练计划项目(201413986009Y); 江苏大学学生科研立项项目(13A170)

**[第一作者]** 夏国华, 硕士, 实验师, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0511-85038403, E-mail: xgh-78131@yeah.net

**[通讯作者]** \* 杨欢, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0511-85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn;

\* 贾晓斌, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型开发研究, Tel: 025-85608672, E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

- [7] 廖沛球, 薛蓉, 吴亦洁, 等. 给药硝酸镉后大鼠尿液和血清的核磁共振代谢组学研究[J]. 分析化学, 2012, 40(9):1421.
- [8] 尤蓉, 李冰, 徐振波, 等. 广东凉茶作用于大鼠的血清代谢组学研究[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012, 40(12):145.
- [9] Peng Jiang, Weixing Dai, Shikai Yan, et al. Biomarkers in the early period of acute myocardial infarction in rat serum and effects of Shexiang Baixin Pill using a metabolomic method protective [J]. J Ethnopharmacol, 2011, (38):530.
- [10] 喻喜华, 毕开顺, 李泽运, 等. UPLC 法同时测定山茱萸生品与酒制品中 5 个组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8):1463.
- [11] 皮文霞, 蔡宝昌, 许惠琴, 等. 山茱萸环烯醚萜总苷对糖尿病血管并发症模型大鼠血清 SOD 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(1):23.
- [12] 汤久瑜. 丙酮酸补充对机体能量代谢的影响[D]. 武汉: 武汉体育学院, 2008.
- [13] 朱惠莲, 许月初, 蒋卓勤, 等. 丙酮酸对肥胖大鼠体重和脂肪代谢的影响[J]. 营养学报, 2002, 24(3):229.

[责任编辑 聂淑琴]