

乌头碱给药大鼠尿液生物标记物的检测

辛杨, 张滢, 张哲, 张伟光, 吕君, 王丽艳, 徐蕾

(齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的: 筛选乌头碱给药大鼠尿液的生物标记物, 寻找该化合物的相关代谢通路。方法: 20只 Wister 大鼠随机分为正常组与给药组, 采用液液萃取法处理生物样品, 利用超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱检测正、负离子模式下空白组大鼠与给药组大鼠尿液中内源性代谢物, 通过主成分分析法对2组大鼠生物样品进行无监督模式的评价, 筛选对分类起关键作用的内源性代谢物, 并寻找可能相关的代谢通路。结果: 共筛选出5个对分类起主要作用的内源性代谢物, 得到结构表征的有4个, 分别为 propionylglycine methyl ester, Cys-Ser-Me, 5, 8-dihydroxy-3, 4-dihydrocarbostyryl, 吡咯-2-羧酸。结论: 乌头碱的镇痛作用可能与体内5羟色胺分泌量的降低有关, 为乌头碱的作用机制研究提供参考。

[关键词] 乌头碱; 超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱; 主成分分析; 生物标记物; 吡咯-2-羧酸; 代谢组学

[中图分类号] R969.1; R284.1; R446.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0089-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030089

Detection of Rats' Urine Biomarkers of Aconitine Poisoning by UPLC/Q-TOF Mass Spectrometry

XIN Yang, ZHANG Ying, ZHANG Zhe, ZHANG Wei-guang, LYU Jun, WANG Li-yan, XU Lei (College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To screen urine biomarkers of rats after administrated aconitine and find out its related metabolic pathways. **Method:** Wister rats were divided into two groups which corresponded to control group (CG) and medication administration team (MAT), respectively. In each group, there were five male rats and five female rats. Biological samples were handled by liquid-liquid extraction method. Ultra high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with time of flight mass spectrometry (TOF-MS) was applied, positive and negative ion mode was used to monitor endogenous metabolites in urine samples of rats, principal component analysis was applied to distinguish biological samples, biomarkers were selected by partial least square discriminant analysis and found out related metabolic pathways of aconitine. **Result:** Four potential biomarkers were identified, which were propionylglycine methyl ester, Cys-Ser-Met, pyrrole-2-carboxylic acid and 5, 8-dihydroxy-3, 4-dihydrocarbostyryl. **Conclusion:** This study indicates that analgesia of aconitine may be associated with reduction of serotonin secretion, which can provide research basis for further study on mechanism of aconitine poisoning.

[Key words] aconitine; UPLC-Q/TOF-MS; principal components analysis; biomarkers; pyrrole-2-carboxylic acid; metabonomics

乌头碱具有抗炎、镇痛、强心等药理作用^[1-3], 其治疗剂量与中毒剂量十分接近, 致使临床应用受到极大限制^[4-7]。代谢组学技术为中药化学成分的研究提供了新思路^[8-9], 是研究有机体内整体代谢变化的新兴学科, 交叉了生物化学与分子生物学, 特别是当有机体吸收外源性药物后, 采用代谢组学研

究法可从整体水平系统地揭示内源性代谢物的变化^[10]。但代谢组学研究对实验仪器的精度要求较高, 所用仪器须配备如模式识别与专家系统等统计软件, 其目的在于定性定量分析内源性代谢物, 以寻找代谢物与机体生理或病理变化的关系。本实验借助于代谢组学整体研究的特点, 采用超高效液相

[收稿日期] 20141208(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403067); 黑龙江省教育厅科技研究项目(12541874); 齐齐哈尔市科技局社会发展指导性计划项目(SFZD-2012087)

[第一作者] 辛杨, 博士, 讲师, 从事中药化学成分质谱分析研究, Tel:13504521632, E-mail:cc.xinyang@163.com

色谱-四级杆/飞行时间质谱检测技术筛选乌头碱给药大鼠尿液中的生物标记物,寻找相关的代谢通路,为乌头碱的作用机制研究提供参考。

1 材料

RRLC 1200-6520 型四级杆-飞行时间色谱质谱联用仪(美国安捷伦公司)。乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110798-200404),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。清洁级 Wister 大鼠,由吉林大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(吉)2003-0001。

2 方法与结果

2.1 样品收集与处理 将 20 只 Wister 大鼠,随机等分为空白组与给药组,2 组大鼠均雌雄各半。实验前适应实验室环境 1 周(25 °C,相对湿度 50%),此期间正常进食,给药前禁食 12 h,自由饮水。给药组大鼠按 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予乌头碱生理盐水溶液,正常组大鼠给予等量空白生理盐水溶液。收集给药后 2 h 的血液与 24 h 内的尿液,处理前生物样品置于 -20 °C 冰箱。尿液样品于 $3\ 000 \times g$ 离心 10 min,取上清液 500 μL 用 10% 氨水调 pH 10,加入等体积乙酸乙酯萃取 2 次,合并乙酸乙酯层,室温挥去溶剂,残渣用甲醇-甲酸水(25:75)混合液 100 μL 溶解^[11],精密量取 5 μL 用于检测。

2.2 检测条件^[12] 液相色谱条件为 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μm),流动相甲醇(A)-0.5% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 1 min, 30% A; 1 ~ 2 min, 40% A; 2 ~ 3 min, 50% A; 3 ~ 10 min, 50% ~ 100% A),流速 0.2 mL \cdot min⁻¹,柱温 30 °C。质谱条件为离子源 Dual ESI,采集模式 MS1,扫描范围 100 ~ 2 000,扫描模式正、负离子,载气温度 350 °C,载气流速 8 L \cdot min⁻¹,锥孔压力 206 kPa,毛细管电压 3.5 kV,碰撞电压 160 V。

2.3 数据采集与处理 分别对各组大鼠的尿液样品进行检测,均采用正、负 2 种离子扫描模式,并对采集的图谱进行分析。将 20 只大鼠的尿液样品基峰色谱图转换成 CEF 文件,借助 Agilent MPP 软件获得全部样品的主成分分析(principal component analysis, PCA)得分图,见图 1, 2。结果显示空白组与给药组大鼠尿样均分布在明显分开的 2 个区域,说明乌头碱给药 2 h 后大鼠体内的内源性代谢物已发生了明显变化,且负离子模式检测下的分类效果优于正离子模式;此外,同组中雌性和雄性大鼠尿样有一定程度的分离,说明在进行动物实验时应同时选用雌性与雄性动物,以免得到片面的结论。通过

偏最小二乘判别分析(partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA)筛选潜在生物标记物,并提供其精确相对分子质量与分子式,将这些信息与二级串联数据结合,进行化合物匹配,确定最为可能的生物标记物。结果在正、负离子模式下分别筛选出了 8, 3 个潜在生物标记物,见表 1。

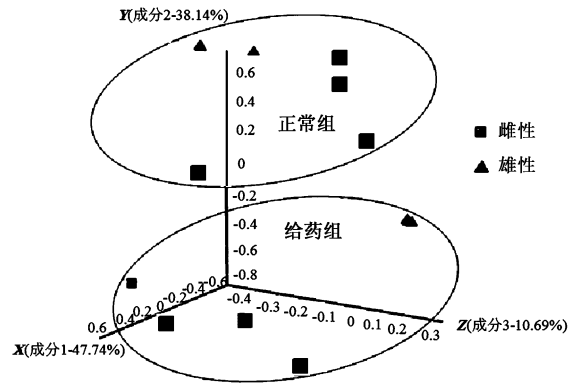


图 1 正离子模式检测大鼠尿液样品 PCA 得分

Fig. 1 PCA scores 3D of metabolites of urine samples in positive mode

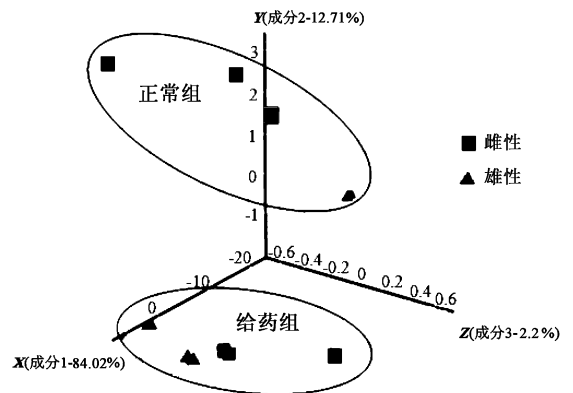


图 2 负离子模式检测大鼠尿液样品 PCA 得分

Fig. 2 PCA scores 3D of metabolites of urine samples in negative mode

3 讨论

经数据库检索,未搜索到与表 1 中生物标记物有关的代谢通路,但搜索到了图 3 所示的代谢通路,图中吡咯-2-羧酸为潜在生物标记物,由于该化合物引起空白组与给药组间的变化倍数 < 2,故表 1 中并未给出其化合物信息。但吡咯-2-羧酸是 2 组大鼠尿液中的内源性代谢物,经软件计算精确 m/z 112. 039,经离子提取,计算其引起 2 组间的变化倍数 0. 582,说明乌头碱在体内对吡咯-2-羧酸有正向调节作用。由图 3 可知,吡咯-2-羧酸与五羟色胺在体内的变化趋势相反,即给药组中吡咯-2-羧酸量升高的同时,五羟色胺量降低。由于五羟色胺是细胞

表 1 乌头碱给药后大鼠尿液中生物标记物信息

Table 1 Informations of potential biomarkers in urine samples after administrated aconitine

化合物	分子式	相对分子质量	t_R /min	离子监测模式	变化数/倍	给药组/正常组
propionylglycine methyl ester	$C_6H_{11}NO_3$	145.073	1.30	正	2.712	下调
Cys-Ser-Met	$C_{11}H_{21}N_3S_2O_5$	339.094	6.83	负	2.416	上调
未知	$C_{11}H_{10}N_{10}O$	298.104	9.58	负	2.552	上调
5,8-dihydroxy-3,4-dihydrocarbostyril	$C_9H_9NO_3$	179.058	4.28	负	2.059	上调

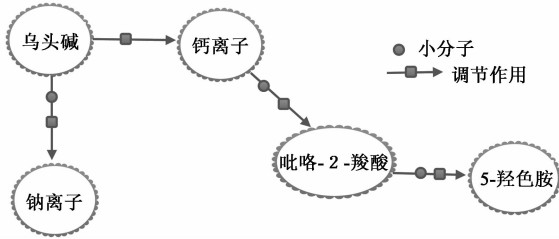


图 3 乌头碱相关代谢通路

Fig. 3 Deduced metabolic pathway related to aconitine

释放的一种致痛物质和炎症介质,在哺乳动物的中枢神经组织中含量较高,其与疼痛感受及止痛功能有关,还与钙通道的活动有关,与调节睡眠、体温和镇痛等均有关^[13-15]。本文共筛选出 5 个与乌头碱毒性作用有关的内源性生物标记物,得到结构表征的有 4 个,分别为 propionylglycine methyl ester, Cys-Ser-Met, 5, 8-dihydroxy-3, 4-dihydrocarbostyril, 吡咯-2-羧酸, 研究结果提示乌头碱的阵痛作用可能与体内 5-羟色胺分泌量的降低有关,可为深入研究乌头碱的作用机制提供参考。

[参考文献]

[1] 张硕峰,吴金英,贾占红,等. 附子中乌头碱对大鼠心功能-毒剂量关系测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 222-225.
 [2] 朱凡,刘小平. 乌头碱醇质体的制备及抗炎镇痛作用研究[J]. 武汉理工大学学报, 2011, 33(8): 30-33.
 [3] 孙虎,王平. 乌头碱经皮给药的急性毒性及相关的镇痛作用研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2064-2067.
 [4] 严妍,杨茂, Rausch W D, 等. 乌头碱对胎鼠中脑多巴胺能神经元细胞的神经毒性作用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(3): 213-215.

[5] 凌珊,龚千锋. 草乌的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(3): 90-94.
 [6] 曹国琼,张永萍,徐剑. 乌头的药理与毒理作用及减毒的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 61-64.
 [7] 陶长戈,李文军,彭成. 乌头碱在大鼠体内的毒代动力学研究[J]. 湖北中医学院学报, 2011, 13(3): 21-23.
 [8] Gika G H, Theodoridis G A, Plumb R S, et al. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics [J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 87(1): 12-25.
 [9] 王献,林树海,蔡宗苇,等. 基于质谱技术的代谢组学研究及其在中国的发展[J]. 中国科学: 化学, 2014, 44(5): 724-731.
 [10] 张辰辰,孙立新. 基于代谢组学的细胞内源性代谢物研究进展[J]. 药学报, 2012, 47(8): 978-985.
 [11] 汤喜兰,徐国良,李冰涛,等. 花椒水提取物给药大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 127-130.
 [12] 李文兰,杨洋,白晶,等. 基于 HPLC-DAD 技术对大鼠灌胃八珍汤后尿液样品处理方法的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 325-328.
 [13] 周航宇,姜淮芜,王明佳. 5-羟色胺及其受体研究进展[J]. 山东医药, 2014, 54(12): 90-93.
 [14] 康庐琛,谭新,张金赫,等. 补肾壮骨冲剂对肠源性 5-羟色胺及骨密度的影响[J]. 世界中医药, 2014, 9(1): 32-35.
 [15] 符琼方,欧奇伟,李茂清. 安宁汤对失眠患者血浆 5-羟色胺和多巴胺水平的影响[J]. 四川中医, 2014, 32(4): 76-78.

[责任编辑 刘德文]