

# 运用代谢组学方法初筛刺五加多糖的药理作用及机制

卢芳<sup>1</sup>, 杨晓丹<sup>1</sup>, 井月娥<sup>1</sup>, 张娜<sup>1</sup>, 刘树民<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:**运用代谢组学方法考察刺五加多糖对正常生理状态大鼠内源性物质代谢的影响,寻找潜在的生物标志物并分析其代谢途径,探讨其药理作用及作用机制。**方法:**SD大鼠随机分为空白组和刺五加多糖给药组,各10只,分别给予生理盐水(灌胃容积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和刺五加多糖( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),连续灌胃20 d,于第21日收集尿样,经处理供UPLC-Q-TOF/MS分析,本实验采用Micromass Markerlynx软件进行色谱峰识别以及峰匹配,并采用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(O-PLS-DA)对获得的多维复杂数据进行降维处理。通过对空白组和刺五加多糖给药组大鼠尿样代谢指纹数据进行分析,根据质荷比匹配生物标志物并查找其代谢途径。**结果:**鉴定出6-二甲基氨基嘌呤,*L*-乙酰肉碱等20个潜在生物标志物,并且其药理活性与神经保护、抗细胞凋亡等有关。**结论:**刺五加多糖对阿尔茨海默病和心血管疾病(CVD)等疾病有一定的药理作用,其作用机制可能与细胞凋亡和兴奋毒性等假说相关。

**[关键词]** 刺五加多糖; 代谢组学; 生物标志物; 阿尔茨海默病; 心血管疾病

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0150-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220150

**Application of Metabonomics Method to Identify Possible Effect of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide on AD** LU Fang<sup>1</sup>, YANG Xiao-dan<sup>1</sup>, JING Yue-e<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>1</sup>, LIU Shu-min<sup>2\*</sup> (1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides (ASPS) on endogenous metabolites in normal rats using metabolomics method, find potential biomarkers, analyze the metabolic pathways, and explore its pharmacological effects and mechanisms of action. **Method:** Twenty SD rats were randomly divided into two groups, namely 10 in the blank group with normal saline treatment ( $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and 10 in ASPS group with ASPS treatment ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for 20 days respectively. Urine samples were collected on day 21 for UPLC-Q-TOF/MS analysis. Micromass Markerlynx software was adopted for chromatographic peak identifying and peaks matching, and the principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (O-PLS-DA) were used for dimension reduction process for the complex multi-dimensional data. Based on the metabolic fingerprinting data analysis of urine samples in blank group and ASPS group, biomarkers were matched according to mass to charge ratio, and their metabolic pathway was identified. **Result:** Twenty potential biomarkers such as 6-dimethylaminopurine and *L*-acetylcarnitine were identified, and their pharmacological activity was found to be related to neuroprotection and resisting cell apoptosis. **Conclusion:** ASPS has a certain pharmacological effects on Alzheimer's disease, cardiovascular disease and other diseases, and its

**[收稿日期]** 20150127(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年-面上连续资助项目(81270056);高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)(20132327110009);黑龙江省普通高等院校新世纪优秀人才培养计划项目(1254-NCET-020);黑龙江中医药大学科研基金项目(杰出人才培养基金)(2013jc01);黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划项目

**[第一作者]** 卢芳,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药药性理论及药效物质基础相关问题研究, Tel:13804525109, E-mail:lufang\_19790501@163.com

**[通讯作者]** \*刘树民,博士,教授,博士生导师,从事中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel:0451-82193278/13945133028, E-mail:keji-liu@163.com

mechanism may be related to cell apoptosis and excitotoxic hypothesis.

[ **Key words** ] *Acanthopanax senticosus* polysaccharides; metabonomics; biomarkers; Alzheimer's disease; cardiovascular disease

刺五加多糖 (ASPS) 是从五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* 的根、根皮及果实中提取分离的多糖,是刺五加主要活性成分之一<sup>[1]</sup>,具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖<sup>[2]</sup>等药理作用,但其作用机制尚不明确。而代谢组学是运用系统研究的手段,分析生物体受干扰刺激后,其全部的(随时间和各个组织)代谢变化响应,因此本实验应用代谢组学技术,研究刺五加多糖对大鼠内源性代谢物变化的影响,进而阐明刺五加多糖的相关药理作用及其作用机制。

## 1 材料

**1.1 仪器** 美国 Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪(四元梯度泵-在线真空脱气机-自动进样器-二极管阵列检测器-柱温箱),美国 Micromass Q-TOF micro™ 四极杆-飞行时间质谱(电喷雾离子源-正离子扫描方法-Lockspray),Masslynx V4.1 工作站,KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

**1.2 药品与试剂** 刺五加多糖[80% 纯度,刺五加, *Acanthopanax senticosus* polysaccharides (ASPS),批号 XC20130515,西安小草植物科技有限责任公司],乙腈(色谱级,美国天地公司,批号 75-05-8),屈臣氏蒸馏水(屈臣氏集团有限公司,许可证号 440106010643),甲酸(色谱级,美国霍尼韦尔公司,批号 64-18-6),亮氨酸-脑啡肽(Sigma 公司,批号 58822-25-6),氢氧化钠(分析纯,Aladdin-阿拉丁试剂有限公司,批号 78-10-4)。

**1.3 动物** SD 大鼠,雄性,20 只,SPF 级,体重(200 ± 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0001,大鼠于室内保持 12 h 光照,12 h 避光循环饲养,给予标准饲料和饮用水,且控制室内温度为(22 ± 1) °C,相对湿度在 40% 左右。大鼠适应环境 1 周后放入代谢笼饲养,适应环境后方可开始实验。

## 2 方法

**2.1 动物分组与样品制备** 将 20 只 SD 大鼠随机分为 2 组,即空白组和刺五加多糖给药组,空白组给予生理盐水(10 mL·kg<sup>-1</sup>,ig),刺五加多糖 ig 给药组给予刺五加多糖的剂量为 100 mg·kg<sup>-1</sup>,连续给药 20 d。于第 21 日收集新鲜尿样,样品于 4 °C

13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,供 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

## 2.2 分析条件

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱 Acquity UPLC™ BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, Waters Corp, Milford, USA); 流速 0.40 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 25 °C; 流动相 A 0.1% 甲酸-水溶液,流动相 B 0.1% 甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱 0 ~ 8 min, 98% A; 8 ~ 10 min, 60% A; 10 ~ 12 min, 2% A; 12 ~ 15 min, 98% A, 进样量 2.0 μL。

**2.2.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),采用正离子扫描检测;毛细管电压正离子扫描为 3 000 V; 样本锥孔电压为 35 V; 分离锥孔电压为 3.0 V; 离子源温度为 110 °C; 脱溶剂温度为 300 °C; 脱溶剂气流量正离子扫描为 600 L·h<sup>-1</sup>; 锥孔气流量为 100 L·h<sup>-1</sup>; 碰撞能为 6 V, 碰撞气为氦气,微通道板电压为 2 450 V,碰撞室压力 < 2.8 × 10<sup>-3</sup> mbar; 准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, [M + H]<sup>+</sup> 556.2771) 溶液,校正溶液进样速度为 100 μL·min<sup>-1</sup>,校正频率为 5 s; 扫描方式为全扫描,质量扫描范围 m/z 50 ~ 900。

**2.3 数据处理** 应用代谢组学技术对数据进行采集和处理是研究的关键步骤。通过现代化学信息学和生物统计学领域的新方法对获得的多维复杂数据进行降维和信息挖掘,是目前代谢组学研究中海量数据进行处理的主要研究方向<sup>[3]</sup>。本实验采用 Micromass Markerlynx 软件进行色谱峰识别以及峰匹配,并采用主成分分析法(PCA)<sup>[4]</sup>和正交偏最小二乘-判别分析法(O-PLS-DA)对获得的多维复杂数据进行降维处理。通过对空白组和刺五加多糖给药组大鼠尿样代谢指纹数据进行分析,比较两组之间各代谢物的上调、下调情况,分析并查找生物标志物及代谢途径,最终得出实验结论。

## 3 结果

本实验通过 Micromass Markerlynx 软件与人类代谢组数据库(HMDB),根据化合物的相对分子质量、结构式、质荷比及离子峰的匹配程度,最终匹配鉴定出 20 个潜在生物标志物(表 1),这些生物标志物在刺五加多糖给药组较空白组的大鼠尿样中呈现一定的上调或下调趋势,并且它们的变量重要性因子

(VIP)都 > 1,可信度较高(表 2)。我们通过 HMDB 数据库以及对大量英文文献分析得知这些化合物大

多为氨基酸、多肽、甘油磷脂、嘌呤核苷酸等,涉及阿尔茨海默症、肌萎缩侧索硬化症及心血管等疾病。

表 1 20 个潜在的生物标志物的信息

Table 1 Information of 20 potential biomarkers

序号	中文名	英文名	相对分子质量	HMDB
1	(R)-肉苁蓉碱	(R)-boschniakine	161.200	30 267
2	6-二甲基氨基嘌呤	6-dimethylaminopurine	163.180	00 473
3	肉苁蓉碱	noradrenochrome	165.146	13 030
4	3-吲哚丙酸	3-indolepropionic acid	189.211	02 302
5	L-乙酰肉碱	L-acetylcarnitine	203.236	00 201
6	未查到	2-methyl-2-[(1-oxo-2-propenyl)amino]-1-propanesulfonic acid	207.247	31 200
7	(E)-久效磷	(E)-monocrotophos	223.164	31 805
8	脯氨酰赖氨酸	prolyl-lysine	243.303	29 022
9	L-γ-谷氨酰-L-缬氨酸	L-gamma-glutamyl-L-valine	246.260	11 172
10	γ-谷氨酰-苏氨酸	gamma-glutamyl-threonine	247.248	29 159
11	棒状花椒酰胺	herculin	251.408	30 275
12	L-磷酸精氨酸	L-phosphoarginine	254.181	29 438
13	谷氨酰异亮氨酸	glutamyl-Isoleucine	259.279	28 822
14	降血糖氨酸 B	hypoglycin B	270.282	29 428
15	(x)-2-庚醇葡萄糖苷	(x)-2-Heptanol glucoside	278.342	35 028
16	精氨酰天冬氨酸	arginyl-aspartate	289.288	28 705
17	12-羟基-8,10-十八碳二烯酸	12-hydroxy-8,10-octadecadienoic acid	296.445	29 998
18	未查到	MG(0;0/14;1(9Z)/0;0)	300.434	11 531
19	赖氨酰酪氨酸	lysyl-tyrosine	309.361	28 963
20	γ-谷氨酰赖氨酸	gamma-glutamyltyrosine	310.303	11 741

表 2 20 个潜在的生物标志物上调或下调情况

Table 2 Up or down situation of 20 potential biomarkers

序号	保留时间/s	质荷比	VIP	趋势	序号	保留时间/s	质荷比	VIP	趋势
1	3.46	162.062	5.675	↑	11	4.00	252.170	4.260	↓
2	3.19	164.078	5.595	↓	12	5.00	255.076	9.447	↑
3	0.58	166.076	3.131	↑	13	2.66	260.159	7.336	↑
4	1.95	190.057	4.025	↑	14	1.81	271.134	1.630	↓
5	0.61	204.139	3.691	↑	15	3.01	279.146	2.159	↑
6	0.32	208.042	6.087	↓	16	0.61	290.130	4.312	↓
7	0.31	224.014	5.356	↑	17	4.29	297.158	7.618	↑
8	1.20	244.128	5.029	↓	18	3.06	301.226	3.819	↓
9	0.92	247.133	1.925	↓	19	1.95	310.139	4.458	↑
10	2.49	248.107	3.748	↑	20	1.76	311.174	6.413	↑

## 4 讨论

4.1 中枢神经系统退行性疾病 中枢神经系统退行性疾病是指一组由慢性进行性的中枢神经组织退行性变性而产生的疾病的总称。病理上可见脑和

(或)脊髓发生神经元退行变性、丢失。主要疾病包括肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS),阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等。但疾病的病因和发病机制尚不清楚,在众多有关假

说中,细胞凋亡和兴奋毒性等假说受到广泛重视。

6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂<sup>[5]</sup>,属于诱导细胞凋亡的烷基化嘌呤类,当细胞浓度为 5 mmol·L<sup>-1</sup>的 6-DMAP 处理 16 h 后,将引起明显的 DNA 碎片、磷脂酰丝氨酸外翻和线粒体膜电位降低,这些都是典型的细胞凋亡标记。经 6-DMAP 处理的细胞在凋亡前,其 Ca<sup>2+</sup> 明显增多,B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bcl-2)表达明显减少。Bcl-2 主要通过抗氧化作用抑制活性氧形成从而抑制细胞凋亡。Ca<sup>2+</sup> 是人体体液中一个重要的常量元素,主要参与机体及细胞内生理生化代谢过程<sup>[6]</sup>。具有调节细胞生长、基因分化,参与介导细胞凋亡的作用<sup>[7]</sup>。

L-乙酰肉碱(LAC)可调节大鼠神经系统中神经生长因子的活性,增加胆碱乙酰转移酶的活性,增强 NGF 受体在纹状体和大鼠海马的发展,以及在不同的神经递质系统中的表达和调节,包括胆碱能和多巴胺能系统<sup>[8]</sup>。此外,LAC 可以选择性诱导大脑皮质的 2 代谢型谷氨酸受体(mGlu2 受体)上调,从而减轻神经性疼痛<sup>[9]</sup>。6-DMAP 和 LAC 与细胞凋亡、兴奋中毒假说相关,因此推断其与 ALS 的发病机制有一定联系。

3-吡啶丙酸被报道可用于 AD 的治疗和预防  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )凝聚<sup>[10]</sup>。

**4.2 心血管疾病** LAC 在细胞呼吸中担任着传递脂肪酸进入线粒体的传递工具。通过脂肪酸  $\beta$ -氧化过程,促进乙酰辅酶 A 运动到哺乳动物线粒体基质中,并产生大量 ATP。LAC 具有保护心肌膜完整性、保护线粒体功能等特性,这将在心血管疾病中发挥重要的作用<sup>[11-13]</sup>。

综上所述,本实验采用代谢组学技术观察刺五加多糖给药后代谢物的变化,分析生物标志物的代谢途径,并且研究其可能的作用及机制,研究发现刺五加多糖与中枢神经系统退行性疾病及心血管疾病有着密切关联,其作用机制可能与细胞凋亡、兴奋中毒假说、保护心肌等机制相关,但其具体机制仍有待研究。因此,阐明刺五加多糖在生物体内的代谢变化规律极为重要,为刺五加多糖的安全性、有效性及合理用药提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010:192-193.

[2] Fu J F, Yuan J, Zhang N Y, et al. Anti-diabetic activities of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASP) in combination with metformin[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50(3): 619-623.

[3] 王晶, 杨杏芬, 许瑛华, 等. 适用于代谢组学研究的人体尿液保存与气相色谱-质谱联用分析方法[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(8): 724-727.

[4] 陈思伟, 陈云明, 刘莉, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 127-131.

[5] Fernandes C B, Devito L G, Martins L R, et al. Artificial activation of bovine and equine oocytes with cycloheximide, roscovitine, strontium, or 6-dimethylaminopurine in low or high calcium concentrations[J]. Zygote, 2014, 22(3): 387-394.

[6] 陈学平, 罗志刚, 曹丽玲, 等. 氨培养胎鼠神经细胞钙离子浓度变化与凋亡的相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(6): 16-18.

[7] 徐欢成, 郑明学, 古少鹏, 等. 钙信号转导对细胞凋亡的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 34(1): 112-115.

[8] Bailey J A, Lahiri D K. Chromatographic separation of reaction products from the choline acetyltransferase and carnitine acetyltransferase assay: differential ChAT and CrAT activity in brain extracts from Alzheimer's disease versus controls [J]. J Neurochem, 2012, 122(4): 672-680.

[9] Nasca C, Xenos D, Barone Y, et al. L-acetylcarnitine causes rapid antidepressant effects through the epigenetic induction of mGlu2 receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(12): 4804-4809.

[10] Dragicevic N I, Copes N, O'Neal-Moffitt G, et al. Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling [J]. J Pineal Res, 2011, 51(1): 75-86.

[11] 王冬燕, 高燕, 米杰. 左旋肉碱对维持性血液透析 1015 例患者心脑血管事件的影响[J]. 中华老年心血管病杂志, 2012, 14(10): 1060-1063.

[12] Molyneux R, Seymour A M, Bhandari S. Value of carnitine therapy in kidney dialysis patients and effects on cardiac function from human and animal studies[J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(2): 285-293.

[13] 张治宇, 袁志忠, 殷仁富, 等. 肉毒碱棕榈酰转移酶-1 活性对饱和脂肪酸诱导乳鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(6): 902-904.

[责任编辑 聂淑琴]