

# 天麻-川芎对偏头痛模型大鼠尿液内源性物质代谢的影响

周本宏<sup>1,2</sup>, 周静<sup>1</sup>, 吴丽宁<sup>2</sup>, 涂杰<sup>2</sup>, 吴玥<sup>1</sup>, 刘刚<sup>1</sup>

(1. 武汉大学人民医院, 武汉 430060; 2. 武汉大学药学院, 武汉 430072)

**[摘要]** **目的:**运用代谢组学方法考察不同配伍比例的天麻-川芎对偏头痛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,为传统中药药对的药理机制研究提供新方法。**方法:**将药材分成4组:天麻组(50 g)、川芎组(50 g)、天麻-川芎A组(天麻-川芎为1:4)、天麻-川芎B组(天麻-川芎为4:1),各组药材分别用10倍量70%乙醇提取。采取注射硝酸甘油的方法建立大鼠偏头痛模型。结合PCA法与PLS-DA法分析不同配伍比例的天麻-川芎对偏头痛大鼠内源性物质影响,结合载荷图信息,寻找生物标志物。**结果:**代谢组学分析表明,与天麻-川芎B组相比,天麻-川芎A组样本点更接近正常对照组,而远离模型组;通过载荷图筛选出16个分类贡献率较大的变量,对其中的9个潜在生物标志物进行了结构鉴定和代谢途径分析。**结论:**代谢组学提供了反映机体整体状态的检测指标,天麻-川芎A组使偏头痛大鼠内源性代谢表型向正常大鼠回归,其作用机制可能涉及到氨基酸代谢及三羧酸循环等代谢过程。

**[关键词]** 天麻; 川芎; 药对; 偏头痛; 代谢组学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0104-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014030104

## Effect of *Gastrodia elata* and *Ligusticum chuanxiong* on Urine Endogenous Metabolism in Migraine Rats

ZHOU Ben-hong<sup>1,2</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>, WU Li-ning<sup>2</sup>, TU Jie<sup>2</sup>, WU Yue<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>

(1. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Pharmaceutical College of Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**[Abstract]** **Objective:** Using metabonomics method to study the influence of different compatibility proportion of *Gastrodia elata* and *Ligusticum chuanxiong* to endogenous metabolites in migraine rats, the purpose of these works was to find potential biomarkers and to analyze the metabolic pathways which can provide new ideas for the pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine. **Method:** The herbs were divided into four groups: *G. elata* Group, *L. chuanxiong* group, *G. elata* and *L. chuanxiong* A (1:4), *G. elata* and *L. chuanxiong* B (4:1). Each group of herbs was extracted with 70% ethanol (10 times the amount of volume). The rat model of migraine was established by injecting nitroglycerin into the organization of rat. The methods of PCA and PLS-DA were used to analysis the influence of different compatibility proportion of *G. elata* and *L. chuanxiong* on endogenous metabolites in migraine rat, and search for biomarkers with load map information. **Result:** The analysis result of metabolomics showed that: compared with *G. elata* and *L. chuanxiong* B group, the score points of *G. elata* and *L. chuanxiong* A group were more closer to the normal control group, farer from the model group; 16 potential biomarkers were selected from the load plot, and 9 potential biomarkers were identified their structure and analyzed metabolic pathways. **Conclusion:** Metabolomics can provide detection indexes that reflect the metabolic state of the body. *G. elata* and *L. chuanxiong* A group can return the endogenous metabolic phenotype of migraine model rat to normal status. Its mechanism may be involved *in vivo* physiological activity, such as amino

**[收稿日期]** 20130325(021)

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金项目(2004ABA176)

**[通讯作者]** \*周本宏,博士,教授,硕士生导师,从事中药及天然药物活性成分的研究, Tel:15335898431, E-mail:benhongzh@whu.edu.cn

acid metabolism and the citric acid cycle.

**[Key words]** *Gastrodia elata*; *Ligusticum chuanxiong*; drug compatibility; migraine; metabolomics

偏头痛与一般头痛不同,它发作时是间接性、反复性的,并且是以一侧头痛为主<sup>[1]</sup>。现代医学认为,偏头痛大多数是属于血管神经性头痛,其发病机制较为复杂,主要有神经源性学说,血管源性学说、三叉神经-血管学说<sup>[2]</sup>等假说。中医理论体系中,偏头痛则多数是属与内伤类头痛,且多和“风”有关<sup>[3]</sup>。天麻、川芎二味因其祛风止痛的特性,常被历代医家用于偏头痛的治疗。近年来,代谢组学技术给中药现代化研究带来了新的思路<sup>[4-7]</sup>。代谢组学研究的主体是机体的整体内源性物质代谢水平,这与中药发挥药效时的整体性是一致的。应用这一具有反应整体思想的代谢组学研究中,对中药有效作用的物质基础、作用机制、作用靶标、安全性、组方依据和配伍规律等研究均有重要意义。

## 1 材料

**1.1 药物** 天麻、川芎购于武汉康圣医药有限公司,经武汉大学药学院张洪教授鉴定分别为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Blume 的块茎和伞形科藜本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的块茎,两种药材均符合《中国药典》2010年版标准。

**1.2 试剂** 乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司),乙酸(色谱纯,美国 Fisher 公司),甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司),乙醇(分析纯)、蒸馏水自制。硝酸甘油注射液(山西康宝生物制品股份有限公司,批号 101003 L2914),尼麦角林片(昆山龙灯瑞迪制药有限公司,批号 110501)。

**1.3 动物** 42 只健康雄性 SD 大鼠,体重均为 180~200 g,华中科技大学同济医学院动物实验中心,动物合格证号 SCXK(鄂)00012710。

**1.4 仪器与软件** AG245 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO),HH-2 型电热控温水浴锅(深圳天南海北实业有限公司),YXJ-1 型离心机(深圳天南海北实业有限公司),安捷伦 1100 型高效液相色谱仪(配备离子阱质谱仪)。

## 2 方法

**2.1 药材提取** 称取干燥天麻和川芎单独粉碎,将药材粗粉分成 4 组:天麻组(天麻 50 g)、川芎组(川芎 50 g)、天麻-川芎 A 组(天麻 10 g,川芎 40 g)、天麻-川芎 B 组(天麻 40 g,川芎 10 g),各组分别加入 10 倍量 70% 乙醇,回流提取 3 次,每次提取 1h,滤

过,减压回收乙醇,浓缩成含生药 11.67 g·mL<sup>-1</sup> 的药材提取液。

**2.2 动物分组及给药** 将 42 只健康雄性 SD 大鼠(体重均为 180~200 g)于动物饲养中心喂养 1 周,随机分为 7 组,即正常对照组、模型组、天麻组、川芎组,天麻-川芎(1:4)A 组、天麻-川芎(4:1)B 组及阳性对照组,每组 6 只。正常对照组 ig 10 mL·kg<sup>-1</sup> 生理盐水,其余各组分别给予相应的药材提取液,每组大鼠每天 ig 体积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,连续 ig 给药 29 d。在第 30 天正常对照组给予生理盐水,阳性对照组给予尼麦角林 25 mg·kg<sup>-1</sup>,其余各组分别给予相应的药材提取液。

**2.3 偏头痛模型造模** 在第 30 天给药后 30 min 采用硝酸甘油对大鼠进行造模:分别皮下(右肩部、额区)注射硝酸甘油注射剂 10 mg·kg<sup>-1</sup>,复制实验性偏头痛动物模型。观察造模 3 min 左右大鼠的行为变化。造模后的大鼠出现前肢频繁挠头,两耳发红,爬笼次数增多,情绪烦躁不安等现象,且这些现象维持约 3 h 后,大鼠转为蜷卧活动减少的状态,说明偏头痛模型复制成功。

**2.4 尿液收集及样品制备** 7 组大鼠分别收集第 30 天给药后 3 h 内尿液,在 -20 °C 低温下保存。低温解冻,4 °C 下 1.5 × 10<sup>4</sup> r·min<sup>-1</sup>,离心 5 min,取上清液 0.5 mL 加入甲醇 0.5 mL,混匀,在 4 °C 下静置 3 h,3 × 10<sup>4</sup> r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,经微孔滤膜滤过后进样。

**2.5 LC-MS 数据的采集与预处理** 色谱柱: Venusil MP-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 3 μL,柱温 35 °C,运行 20 min。梯度洗脱 0 min 时; 8 min,70% A;12 min 90% A;14 min,后运行 5 min。毛细管电压 4 000 V,雾化器压力 40 psi,干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>,干燥气温度 350 °C,全扫描监测得总离子流色谱图,提取质谱信息,得到尿液样品所含物质的质荷比。

**2.6 数据收集处理及生物标志物判定** 原始数据经标准化与中心化处理后,使用 SIMCA-P 软件对 7 组大鼠尿液进行主成分分析(principal component analysis, PCA),通过得分图比较各组样本组间的差异,筛选出对偏头痛模型组代谢影响最大的给药组,并进行偏最小二乘法判别分析(partial least squares-

discriminant analysis, PLS-DA), 寻找造成组间差异的生物标志物。

### 3 结果

**3.1 改善偏头痛行为学评价** 耳红: 观察大鼠造模后耳红出现和消失的时间。挠头: 从造模之时起观察大鼠造模后一段时间挠头的次数。挠头出现时间以大鼠出现连续挠头次数达 5 次以上为标志, 消失时间以一个时间段中大鼠挠头次数少于 5 次并出现倦怠、疲乏为标志<sup>[8]</sup>。结果见表 1。

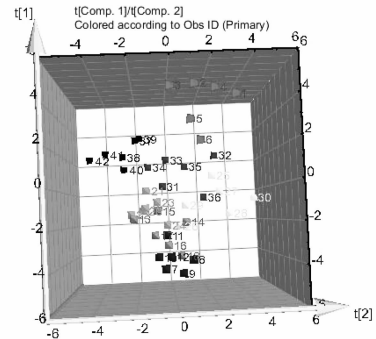
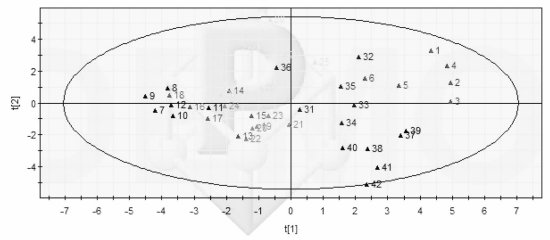
表 1 各组大鼠耳红出现和消失的时间及 3 h 挠头次数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	耳红出现/min	耳红消失/min	挠数/次
正常对照	0 ± 0	0 ± 0	13.17 ± 1.17
模型	8.95 ± 2.25	159.33 ± 19.02	35.50 ± 1.87
天麻 <sup>3)</sup>	10.02 ± 2.35 <sup>2)</sup>	141.17 ± 15.03 <sup>2)</sup>	25.67 ± 3.62 <sup>2)</sup>
川芎 <sup>3)</sup>	12.47 ± 2.58 <sup>2)</sup>	134.83 ± 18.15 <sup>2)</sup>	24.17 ± 3.92 <sup>1)</sup>
天麻-川芎 A(1:4) <sup>3)</sup>	14.73 ± 2.62 <sup>2)</sup>	124.50 ± 16.81 <sup>1)</sup>	21.83 ± 3.54 <sup>2)</sup>
天麻-川芎 B(4:1) <sup>3)</sup>	12.38 ± 2.63 <sup>2)</sup>	133.50 ± 17.33 <sup>2)</sup>	24.83 ± 3.87 <sup>2)</sup>
尼麦角林 <sup>4)</sup>	16.15 ± 2.13 <sup>1)</sup>	121.67 ± 16.26 <sup>2)</sup>	18.67 ± 4.76 <sup>2)</sup>

注: 与模型组相比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>剂量为生药量 116.7 g·kg<sup>-1</sup>; <sup>4)</sup>剂量为 25 mg·kg<sup>-1</sup>。

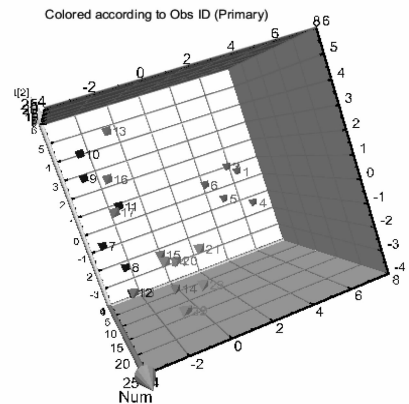
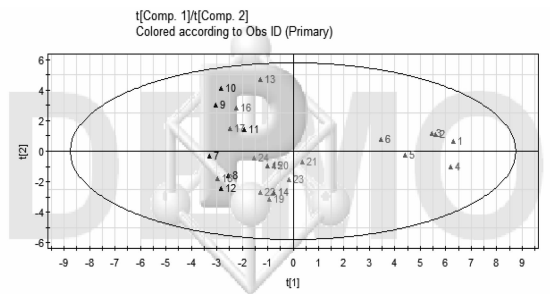
**3.2 不同配伍比例的天麻-川芎对偏头痛大鼠尿液内源性物质的影响** 图 1 所示的是 7 组大鼠尿液样本的 PCA 得分图。正常对照组与偏头痛模型组样本点距离较远, 可以被清楚地区别开, 其他各组则大体分布在正常对照组与模型组之间。阳性对照组最接近正常对照, 甚至有部分交叉, 显示在造模后给予阳性药物使大鼠尿液的代谢状态基本恢复了正常。天麻-川芎 A 组、天麻-川芎 B 组、天麻组与川芎组的样本点都不同程度地远离了模型组样本点, 表明给予这 4 种药物后, 偏头痛大鼠尿液中内源性物质发生了变化。与其他 3 组给药组相比, 天麻-川芎 A 组样本点所处位置与尼麦角林组最接近, 这说明该组引起偏头痛大鼠尿液的代谢改变情况与尼麦角林组最相似。

**3.3 天麻-川芎 A 组对偏头痛大鼠尿液内源性物质代谢途径的影响** 从正常对照组, 尼麦角林组, 天麻-川芎 A 组与模型组 PCA 与 PLS-DA 的得分图 2, 3, 可以看到模型组与其他组呈现出明显的区分。PLS-DA 得分图比 PCA 得分图的组间分类效果好, 减少了组内差异, 提高得分图中组内样本点的聚集性, 有利于生物标志物的寻找。PLS-DA 还可根据载荷图得到 VIP 柱状图, 并显示出各个变量的 VIP 值,



1 ~ 6. 模型组; 7 ~ 12. 正常对照组; 13 ~ 18. 尼麦角林 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组; 19 ~ 24. 天麻-川芎 A 组; 20 ~ 30. 天麻-川芎 B 组; 31 ~ 36. 川芎组; 37 ~ 42. 天麻组; 19 ~ 42 剂量均为 116.7 g·kg<sup>-1</sup> (图 2 ~ 3 同)

图 1 7 组大鼠尿液样本 PCA 平面得分与三维得分



1 ~ 6. 模型组; 7 ~ 12. 正常对照组; 13 ~ 18. 尼麦角林 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组; 19 ~ 24. 天麻-川芎 A 116.7 g·kg<sup>-1</sup> 组 (图 3 同)

图 2 各组 PCA 平面得分与三维得分

见图 4。评价 PLS-DA 模型中变量的重要程度一般用 VIP 值来表示, 其值越大越重要, VIP 值 > 1 的变

量可作为生物标志物的候选变量<sup>[9-11]</sup>。结果中发现共有 16 个变量值的 VIP 值 >1, 结合载荷图和筛选候选变量,通过这些变量代表的化合物的质谱信息,从 METLIN, PubChem, KEGG, HMDB 等数据库中查找可能的化合物结构,并结合文献资料及标准品鉴别等方法,寻找可能的生物标志物,分析其代谢途径,结果见表 2。

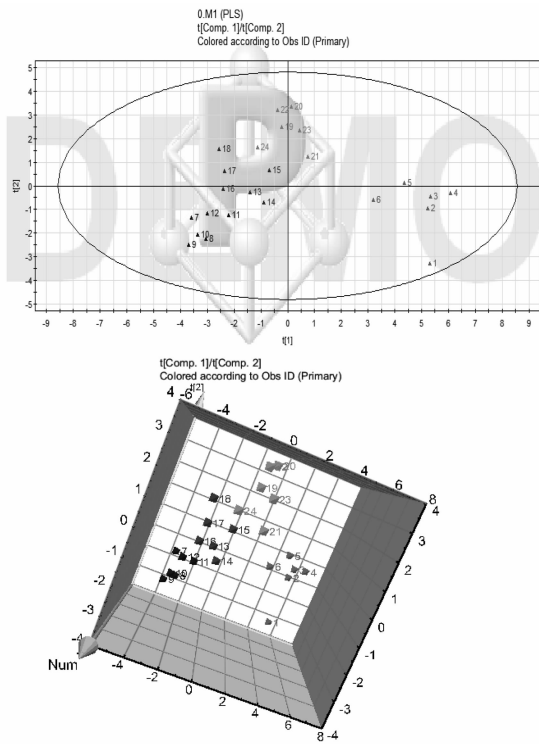


图 3 各组 PLS-DA 平面得分与三维得分

表 2 潜在生物标志物

相对分子质量	可能物质	变化趋势		分子式
		模型组 <sup>1)</sup>	天麻-川芎 A 组 <sup>2)</sup>	
205.34	硫辛酰胺	增多	增多	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NOS <sub>2</sub>
204.08	色氨酸	增多	减少	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
118.02	琥珀酸	减少	增多	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
113.05	肌酐	无明显变化	无明显变化	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O
179.05	马尿酸	无明显变化	增多	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
131.09	亮氨酸	增多	减少	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>
192.02	柠檬酸	减少	增多	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
244.06	尿苷	无明显变化	无明显变化	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
181.07	酪氨酸	减少	增加	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>

注: <sup>1)</sup>表示与正常对照组比较; <sup>2)</sup>表示与模型组比较。

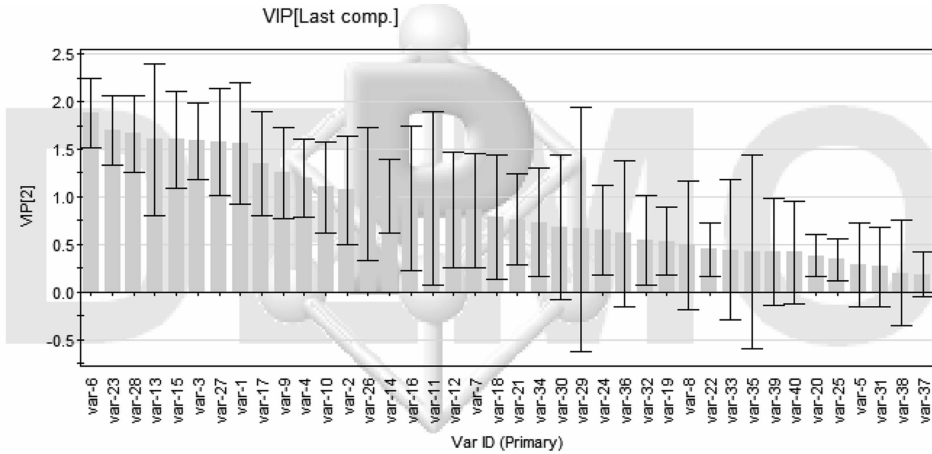


图 4 各组 PLS-DA 的 VIP 柱状示意

#### 4 讨论

分析各生物标志的代谢途径可以更好地了解药物对机体的影响。色氨酸参与的代谢途径主要涉及到 5-羟色胺(5-HT)的生物合成。5-HT 可与 5-HT<sub>1</sub>受体产生结合作用,促使偏头痛发作<sup>[12]</sup>。这与血管源学说认为 5-HT 在偏头痛的产生中发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>是一致的。模型组的大鼠尿液中色氨酸含量较正常大鼠高,显示色氨酸代谢途径发生变化,这种变化可能导致偏头痛的产生。而天麻-川芎 A 组尿液中色氨酸含量比模型组稍低,表明色氨酸代谢较模型组减少,5-HT 生成减少,说明天麻-川芎可使

偏头痛大鼠内源性物质趋于恢复正常。亮氨酸它与异亮氨酸和缬氨酸都是必须氨基酸。由于亮氨酸易于转化为葡萄糖,因此亮氨酸还对调节血糖水平有一定的作用。当缺乏亮氨酸时,机体可头晕,头痛,抑郁等症状。这可能与亮氨酸可以降低大脑 5-羟色胺和多巴胺有关。脑内 5-HT 含量下降对偏头痛也具有一定的缓解作用。琥珀酸在体内的代谢主要是在三羧酸循环的过程中。同时,琥珀酸还参与苯丙氨酸的代谢过程。在给予天麻-川芎提取物后,大鼠体内琥珀酸与酪氨酸的排泄量增加,推测可能是机体可能对其利用减少,进而减少代谢途径中儿茶

酚胺类物质的生成量,进而减弱对偏头痛的促进作用。柠檬酸是一种弱酸,它是在三羧酸循环过程中的主要生成产物,具有特殊活性。血浆中的柠檬酸浓度一般很少用于疾病的诊断或评价指标。然而,检测尿中柠檬酸排泄量却可作为一种常见的肾结石或肾小管性中毒的评价指标。同时它还是骨骼疾病的鉴别诊断指标之一。硫辛酰胺,则参与糖酵解反应及亮氨酸、缬氨酸等氨基酸的降解过程。同时它还是三羧酸循环作用过程中的主要中间体<sup>[14]</sup>。当大鼠注射硝酸甘油进行造模后,可能导致体内糖酵解,三羧酸循环等过程出现紊乱,硫辛酰胺在正常机体的平衡被扰乱,致使其生成量增多,排泄量也随之增多。马尿酸在体内的生成过程主要的外源性前体是甲苯等芳香族化合物。马尿酸具有多种生理病理意义,常被用作肾病及甲苯中毒的标志物。不过即使吸收少量的甲苯氧化芳香族化合物,包括邻、间苯甲酚时也会使尿液中的马尿酸浓度增高。在本文的研究中,模型组大鼠尿液中的马尿酸排泄量减少,可能是外界进行造模方法影响到机体的整体状态,使马尿酸生成减少,但是其具体机制尚未明确。天麻-川芎 A 组与天麻-川芎 B 组大鼠尿液的马尿酸含量相对模型组有所增加,可能是由于大鼠摄入外源性物质引起。天麻素结构中含有甲苯氧化芳香族化合物的骨架,且羟基较多,属于多酚物质,这些结构都利于马尿酸的生成,故尿中含量增加可能和大鼠摄入天麻素有一定联系。肌酐主要参与的是精氨酸与脯氨酸的代谢过程。尿苷是核苷酸的一种,它的作用主要是合成 RNA。在模型组与天麻-川芎 A 组中肌酐与尿苷的含量没有明显变化,可能是这两种物质与偏头痛发病机制无关。

综上所述,9 种生物标志物影响大鼠体内的内源性代谢途径各有不同。其中色氨酸、酪氨酸与琥珀酸这 3 个内源性物质与偏头痛发病机制联系较为紧密,其他几种生物标志物与偏头痛的具体联系还有待进一步研究。琥珀酸、硫辛酰胺与柠檬酸都参与了三羧酸循环,这两个物质的代谢变化可在一定程度上反映机体三羧酸循环是否处于正常状态。总体上看,天麻-川芎(1:4)对偏头痛大鼠内源性物质的影响主要表现在氨基酸代谢和三羧酸循环过程这两方面。天麻-川芎对偏头痛的治疗作用揭示了中药多种成分共同作用于多个靶点的综合治疗效果。运用代谢组学的方法探讨天麻-川芎对偏头痛模型大鼠尿液内源性物质代谢的影响,研究中药多种成

分对机体整体代谢水平的影响与中药发挥药效的整体性水平是一致的,这为进一步研究中药的作用机制提供了新的思路和方法。

#### [参考文献]

- [1] 毛悦时. 偏头痛发病机理研究进展[J]. 国外医学:神经病学神经外科分册,1996,26(2):79.
- [2] Yi B, Yu Y, Liang Y Z. Investigation of antimicrobial model of *Hemshleya pengxianensis* Chang W. J. and its main active component by metabolomics technique[J]. Ethnopharma, 2008,116(1):89.
- [3] 陈官华. 偏头痛的中医内科治疗[J]. 中医临床研究, 2011,3(4):77.
- [4] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica,1999, 29(11):1181.
- [5] Xie B, Gong T, Gao R, et al. Development of rat urinary HPLC-UV profiling for metabonomic study on Liuwei Dihuang pills[J]. J Pharm Biomed Anal,2009, 49(2):492.
- [6] Chen M, Su M, Zhao L, et al. Metabonomic study of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats [J]. Proteome Res,2006,5(4):995.
- [7] Wei L, Liao P, Wu H, et al. Toxicological effects of cinnabar in rats by NMR-based metabolic profiling of urine and serum [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2008, 227(3):427.
- [8] 付先军,宋旭霞,周永红,等. 硝酸甘油型实验性偏头痛大鼠模型行为症状学评价[J]. 中华神经医学杂志,2005,5(4):449.
- [9] Quincy T, Wenlin H, Timothy W, et al. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics [J]. Metabolomics,2009, 5:199.
- [10] Wishart D S, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: The human metabolome database [J]. Nucleic Acids Res, 2007,35:521.
- [11] Nelly A, Jeffrey D V, John R, et al. John Rathmacher Identification of 1-and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling [J]. Anal Biochem, 2011, 410:84.
- [12] 唐勇,张婧,姚志剑,等. 色氨酸羟化酶 1 与 5-羟色胺 2A 受体基因对抑郁症患者额叶情绪加工的影响 [J]. 临床精神医学杂志,2011,21(6):361.

[责任编辑 邹晓翠]