

黄连解毒汤中君-使药对黄连-栀子 干预 2,4-二硝基苯酚热病证候模型的代谢组学

何薇, 荆雷, 刘树民*, 刘东敏, 黄志桓, 祖金祥
(黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 基于代谢组学理论, 探讨黄连-栀子药对干预 2,4-二硝基苯酚致热病证候模型中生物标记物的变化规律。方法: 运用 UPLC-MS 技术手段, 利用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘-判别分析法 (PLS-DA) 数据解析方法, 确定黄连-栀子药对对 2,4-二硝基苯酚致热病证候模型大鼠尿液中生物标记物的影响。结果: 初步确定 2,4-二硝基苯酚致热病证候模型 97 个生物标志物, 其中药对对 31 个生物标志物具有明显干预作用。结论: 应用代谢组学方法, 初步说明黄连-栀子药对对热病证候具有治疗作用。

[关键词] 黄连-栀子; 代谢组学; 生物标记物; 热病证候; 2,4-二硝基苯酚

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0173-06

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1116.002 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:16

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1116.002.html>

Effect of 'JUN-SHI' Herbal Compatibility 'Coptis chinensis-Gardenia jasminoides' on Fever Syndrome Model Induced by 2,4-Dinitrophenol Based on Metabonomics

HE Wei, JING Lei, LIU Shu-min*, LIU Dong-min, HUANG Zhi-huan, ZU Jin-xiang

(Institute of Traditional Chinese Medicine Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the the effect of 'Coptis chinensis Gardenia jasminoides' on the fever syndrome model induced by 2,4-dinitrophenol based on metabonomics. **Method:** The metabolites in rats urine of 2,4-dinitrophenol-induced fever syndrome model were determined by UPLC-MS and then analyzed by Principle Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares discrimination analysis (PLS-DA). **Result:** Ninety-seven biomarkers on the fever syndrome model induced by 2,4-dinitrophenol were found, and the herbal compatibility have effect on 31 biomarkers of them. **Conclusion:** The result indicated that the effect on fever syndrome model induced by 2,4-dinitrophenol is related to metabonomics.

[Key words] metabonomics; biomarker; fever syndrome; 2,4-dinitrophenol

黄连解毒汤原载于《外台秘要》,由黄连、黄柏、黄芩、栀子组成,被视为清热解毒之代表方剂,主治一切实热火毒、三焦热盛之证。而“君-使”作为复方

中的核心药对,在中药理论中具有相互增效并调和药性,引药归经的作用,所以研究这种核心的配伍关系,既能抓住复方药的核心重点,又能简化复方药物

[收稿日期] 20110410(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(2007CB512608)

[第一作者] 何薇, 硕士, 从事中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel: 15846534490, E-mail: 39535056@qq.com

[通讯作者] * 刘树民, 院长, 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: 0451-82196163, Fax: 0451-82196181, E-mail: lsm@hljuem.net

研究的复杂性,此种研究对于提高临床疗效、发掘和提高中医药理论具有十分重要的作用。

代谢组学^[1]作为一门新发展的技术,借助高通量、高灵敏度与高精确度的现代分析技术,分析生物样本如血液,尿液中的内源性代谢物,并通过其动态变化来观测中药对机体所产生的整体效应,其思想具有与中医理论整体观念相一致的特点,并可根据代谢物组的变化,发现生物标志物,阐明中药的整体效应,包括协同作用。

皮下注射 2,4-二硝基苯酚刺激动物出现无菌性炎症,模拟临床非感染性发热模型,25 mg·kg⁻¹大鼠剂量诱导的热病证候模型可持续发热约 3 h,是短程热病证候模型的代表造模试剂,可作为复制热病证候模型的可靠方法^[2]。本文应用代谢组学方法研究 2,4-二硝基苯酚热病证候模型,使用主成分分析法(PCA)和偏最小二乘-判别分析法(PLS-DA)^[3],研究黄连-栀子药对干预模型的生物标志物的变化规律,阐明黄连-栀子药对对热病证候的治疗作用。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters Acquity™ UPLC 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™ 型四极杆-飞行时间质谱(电喷雾离子源-正负离子扫描方法-Lockspray),MassLynx V4.1 工作站,KDC-160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),METTLER-TOLEDO AG135 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),MC-612 型电子数字式体温计(欧姆龙公司)。

1.2 药品及试剂 2,4-二硝基苯酚(上海华东师范大学化工厂),色谱级乙腈(墨克公司),屈臣氏蒸馏水,色谱级甲酸(美国霍尼韦尔公司),脑啡肽(SIGMA 公司),分析级氢氧化钠。黄连(鸡爪连)产地四川,经黑龙江中医药大学中医药研究院王连芝副研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* franch 的干燥根茎;栀子(产地江西樟树)为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Eills 的干燥果实。

2,4-二硝基苯酚-氢氧化钠溶液制备:精密称取 2,4-二硝基苯酚 200 mg,置于 60 mL 生理盐水中,滴加 5 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液,不断搅拌,待药液澄清变为亮黄色,再加入生理盐水至 80 mL。

黄连栀子水煎液细粉制备:黄连与栀子药材各

300 g,共同加入蒸馏水浸泡 2 h,分别用 8,6 倍蒸馏水加热回流 1.5 h,四层纱布三层脱脂棉过滤,合并 2 次滤液,60 ℃ 水浴挥干,电热鼓风干燥箱 40 ℃ 烘干,过 120 目筛制成干细粉。出膏率为 20.28%。

1.3 动物 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体重为(200 ± 20) g(北京维通利华实验动物技术有限公司),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)℃、相对湿度在 40% 左右。大鼠于三级清洁实验室中,标准条件下代谢笼中分笼饲养,大鼠适应环境一周后方可开始实验。

1.4 模型制备、给药及样品采集 取 Wistar 大鼠,雄性,适应环境 3 d 后,以 MC-612 型电子数字式体温计测定大鼠肛温,每日早晚各测量体温 1 次,连续 3 d,选取基础肛温在 37.5 ~ 39 ℃,波动在 0.5 ℃ 以内者纳入实验,随机分为空白组、模型组、给药组(14.4 g·kg⁻¹ 体重灌胃);除空白组外,应用 2,4-二硝基苯酚造模,皮下注射 2,4-二硝基苯酚(25 mg·kg⁻¹ 体重);实验组分别于造模前 30 min 灌胃给予黄连栀子水煎液,空白和模型组给予同体积的蒸馏水。于造模后 1, 2, 3, 4, 5 h 各时间分别监测体温 1 次;同时于造模前 3 天用代谢笼收集 24 h 尿液,每日上午 8 点收集 1 次,连续 3 d,尿液置于冰中保存;于 2,4-二硝基苯酚(25 mg·kg⁻¹ 大鼠体重)造模后 1, 3, 5, 7, 13, 22 h 各时间点的分别收集尿液 1 次,尿液置于冰中保存,尿液样品于 4 ℃, 13 000 r·min⁻¹ 离心 50 min,取上清液供 UPLC-MS 分析。

1.5 分析条件

1.5.1 色谱条件 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ column 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, Waters Corp, Milford, USA),流速 0.40 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,流动相 A 0.1% 甲酸-水溶液,流动相 B 0.1% 甲酸-乙腈溶液,梯度洗脱程序(表 1)。样品不经紫外检测器直接导入质谱系统检测。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	流速 /mL·min ⁻¹	流动相 A /%	流动相 B /%	洗脱曲线
0	0.4	98	2	6
8	0.4	60	40	6
10	0.4	2	98	6
12	0.4	98	2	6
15	0.4	98	2	6

1.5.2 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3 000 V,样本锥孔电压35 V,分离锥孔电压3.0 V,离子源温度110 ℃,脱溶剂温度300 ℃,脱溶剂气流量正离子扫描 $600 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$,锥孔气流量 $100 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$,碰撞能3 V,碰撞气氦气,微通道板电压2 450 V,碰撞室压力 $<2.8 \times 10^{-3} \text{ mbar}$ 。每0.1 s采集1次谱图,每次采集0.48 s。准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, $[M+H]^+556.2771$)溶液,校正溶液进样速度 $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,校正频率5 s,全扫描质量范围 $m/z 50 \sim 1\,000$ 。

2 结果

2.1 体温变化 以造模前大鼠体温平均值为基数,计算并绘制各测定时间点体温变化图(图1)。结果表明:黄连栀子药对于2,4-二硝基苯酚热病证候模型具有明显的干预作用,给药组的发热峰值明显低于模型组,且回调速度也优于模型组。

2.2 代谢组学研究

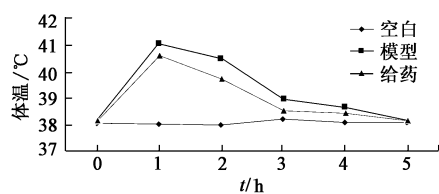
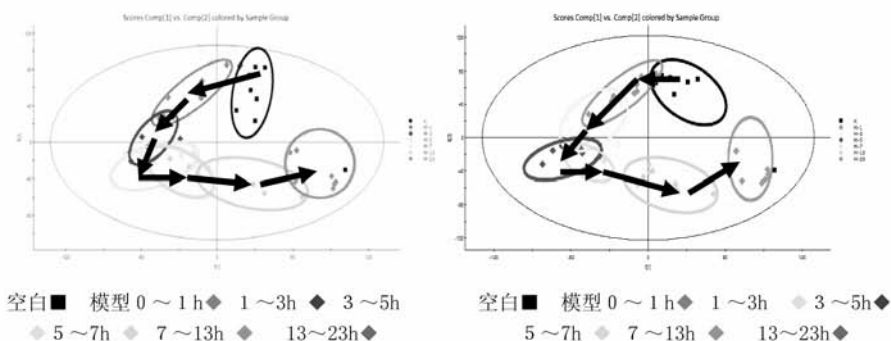


图1 空白组、模型组、给药组体温均值变化

2.2.1 2,4-二硝基苯酚诱导的热病证候模型的整体代谢轨迹 研究代谢产物的整体变化轨迹,可推测出动物在病理状态下发生的一系列变化。对空白对照组与模型组的数据进行分析,由PCA得分图(图2)可知:大鼠皮下注射2,4-二硝基苯酚后尿液代谢物组发生了明显的变化,随着造模后所处时间段的不同,其代谢产物发生了一定的变化。在造模后0~3 h,各个时间点的内源性产物分堆聚类,且逐渐远离空白组,分类趋势越加明显,并在在3~5 h达到最大值;在造模后13~22 h,内源性产物的种类、浓度和相对比例又逐渐回调至空白组位置。



A. 阳离子 PCA 得分; B. 阴离子 PCA 得分

图2 2,4-二硝基苯酚模型组大鼠不同时间段尿液中代谢产物变化趋势得分

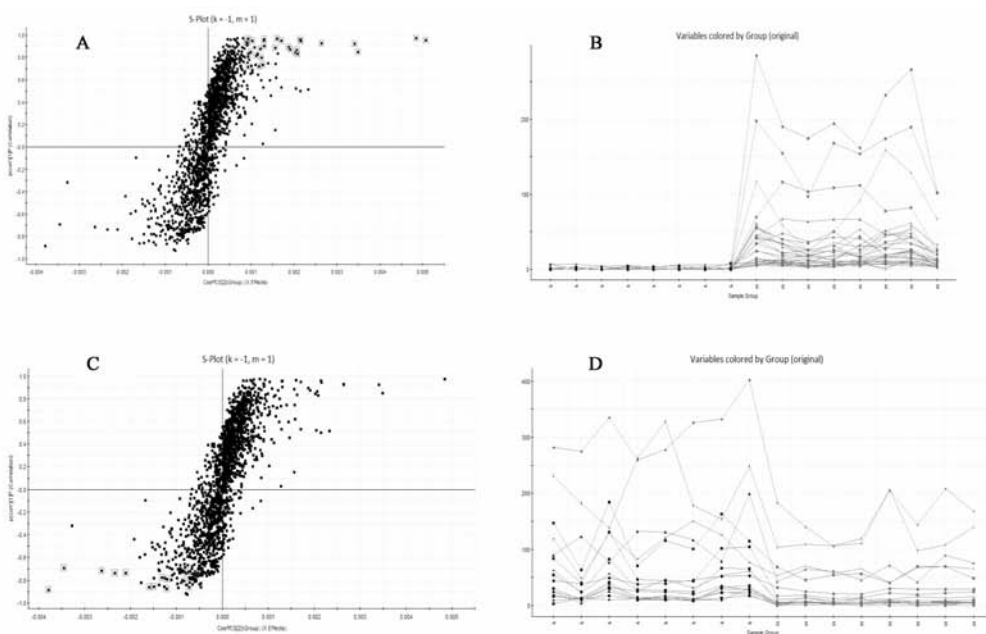
2.2.2 2,4-二硝基苯酚致热病证候模型的生物标志物的确定 造模后3~5 h大鼠代谢轮廓变化最大,离空白组最远,对造模前和造模后3~5 h的尿液代谢轮廓进行OPLS-DA方法分析,根据S-Plot图中各离子点的置信度和贡献度可知何种代谢物对分类贡献最大,结合考虑代谢物的VIP值与空白和模型大鼠尿液中的含量变化趋势图,找到的代谢物可被认为是2,4-二硝基苯酚对大鼠代谢产生影响的特征性生物标志物(图3,4)。

此方法初步筛选了46个具有显著分类意义的2,4-二硝基苯酚致热病证候模型的阳离子生物标志物,其中表现为上调的有30个,下调的有16个;以及51个具有显著分类意义的2,4-二硝基苯酚致热

病证候模型的阴离子生物标志物,其中表现为上调的有38个,下调的有13个。

2.2.3 黄连栀子干预2,4-二硝基苯酚热病证候的研究 从已经确定的2,4-二硝基苯酚致热病证候模型的内源性生物标志物后,考察黄连栀子对药对已确定的特征性生物标志物的相对强度具有干预作用。确定了黄连栀子对药给药前后热病证候模型特征性生物标志物的含量变化趋势;同时绘制黄连栀子干预后大鼠尿液中特异性生物标志物的trend plots(图5)。

从离子趋势图的变化分析,黄连栀子对药对热病证候中表现上升的阳离子生物标志物,其中有19个有抑制上升的作用;对于表现为上升的阴离子生

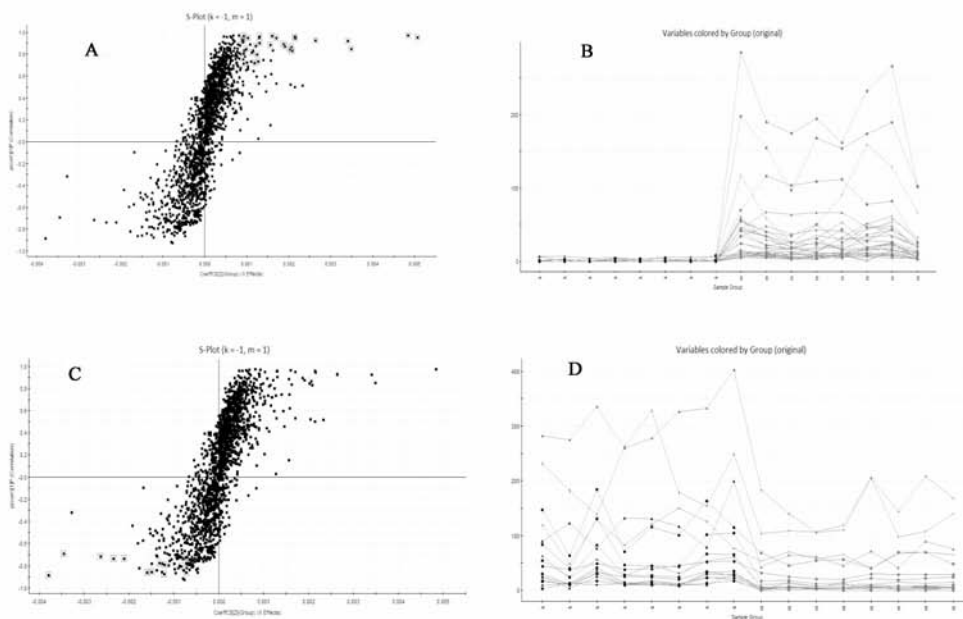


图中 K 表示空白组, M 表示造模后 3~5 小时。红框圈定的为挖掘的的潜在阳离子生物标志物。

A 和 C 为 S-Plot 图: 其中 A 为表现上调离子, C 为表现下调离子。

B 和 D 为对应的含量变化趋势图: 其中 B 为表现上调离子, D 为表现下调离子。

图 3 造模前和造模后 3~5 h 大鼠尿液中阳离子代谢轮廓的 S-Plot (A, C) 图及对应生物标志物的变化趋势 (B, D)



图中 K 表示空白组, M 表示造模后 3~5 小时。红框圈定的为挖掘的的潜在阴离子生物标志物。

A 和 C 为 S-Plot 图: 其中 A 为表现上调离子, C 为表现下调离子。

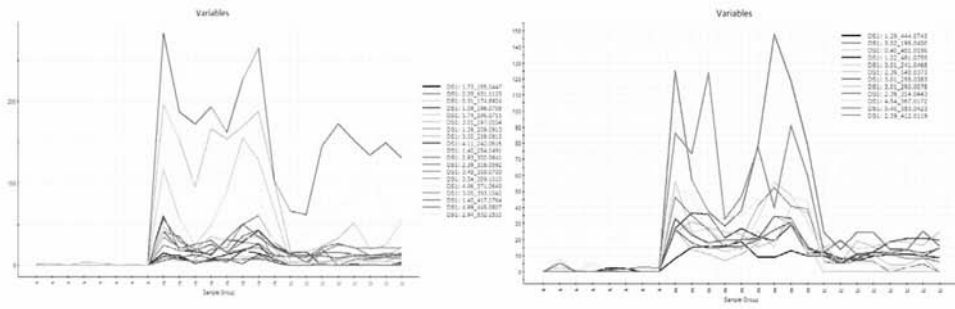
B 和 D 为对应的含量变化趋势图: 其中 B 为表现上调离子, D 为表现下调离子。

图 4 造模前和造模后 3~5 h 大鼠尿液中阴离子代谢轮廓的 S-Plot (A, C) 图及对应生物标志物的变化趋势 (B, D)

物标志物, 其中亦有 12 个有抑制上升的作用, 对表现下降的离子, 不具有明显作用。

根据质荷比和同位素组成, 利用 Masslynx 软件

中元素组成分析, 并结合化学知识, 初步推测了黄连栀子干预的这 31 个生物标志物可能的化学分子式 (表 2, 3)。



A. 阳离子; B. 阴离子

图5 给药干预后回调的离子生物标志物变化趋势

表2 黄连栀子干预的热病证候模型阳离子生物标志物的化学信息

No.	t/min	[M + H] ⁺ m/z		变化趋势	药物干预后 变化趋势	偏差 ΔmD	拟合度 i-FIT	推测化学式
		测量值	计算值					
1	2.84	174.112 5	174.113	↑	抑制上升	-0.5	0.3	C ₈ H ₁₆ O ₃ N
2	0.31	174.898 5	174.901 6	↑	抑制上升	-3.1	0	CH ₃ O ₂ S ₄
3	1.08	196.070 9	196.072 2	↑	抑制上升	-1.3	0.1	C ₈ H ₁₀ O ₃ N ₃
4	1.74	196.071 1	196.068 2	↑	抑制上升	2.9	1.8	C ₃ H ₁₀ O ₅ N ₅
5	3.01	197.055 5	197.056 2	↑	抑制上升	-0.7	0	C ₈ H ₉ O ₄ N ₂
6	1.39	209.091 8	209.092 6	↑	抑制上升	-0.8	0	C ₁₀ H ₁₃ O ₃ N
7	3.01	238.081 8	238.082 8	↑	抑制上升	-1	0	C ₁₀ H ₁₂ O ₄ N ₃
8	4.11	242.061 6	242.059 9	↑	抑制上升	1.7	0.4	C ₉ H ₁₂ O ₃ N ₃ S
9	1.40	254.149 1	254.150 5	↑	抑制上升	-1.4	1.3	C ₁₂ H ₂₀ O ₃ N ₃
10	2.93	300.064 2	300.065 4	↑	抑制上升	-1.2	0	C ₁₁ H ₁₄ O ₅ N ₃ S
11	2.39	316.059 4	316.060 3	↑	抑制上升	-0.9	0	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ N ₃ S
12	3.46	358.069 8	358.068 4	↑	抑制上升	1.4	1.8	C ₁₇ H ₁₆ N ₃ O ₂ S ₂
13	3.53	359.101 3	359.103 9	↑	抑制上升	-2.6	0	C ₁₄ H ₁₅ O ₂ N ₈ S
14	4.93	371.065 4	371.067 5	↑	抑制上升	-2.1	0.3	C ₁₄ H ₁₁ O ₃ N ₈ S
15	3.00	393.104 1	393.105 1	↑	抑制上升	-1	0.5	C ₁₉ H ₁₈ N ₆ SP
16	1.40	417.176 7	417.176 6	↑	抑制上升	0.1	0.9	C ₂₂ H ₃₀ O ₂ N ₂ SP
17	4.99	445.080 7	445.081 8	↑	抑制上升	-1.1	1.2	C ₁₉ H ₁₇ O ₇ N ₄ S
18	2.94	532.150 0	532.148 4	↑	抑制上升	1.6	1	C ₃₅ H ₂₂ ON ₃ S
19	2.39	631.112 6	631.114 2	↑	抑制上升	-1.6	0.4	C ₂₃ H ₂₃ O ₈ N ₁₀ S ₂

子结构清楚,构效关系明确的化学药品也许适用,但对于中医理论指导下的中药,尤其是复方制剂,检测任何一种活性成分均不能反映其整体疗效,因为中医辨证施治用的是药味而非某个化学成分。

近年来,从“君臣佐使”组方原则的角度进行拆方研究的报道很多,表明方剂的药效是由多种药物相互协调和配合所产生的^[4]。药对的配伍规律也体现着方剂配伍规律,考虑到方剂组成的复杂性,从药对的角度进行配伍规律的研究无疑是一种很好的思

路和方法^[5]。

王锐等应用高效液相色谱-质谱分析方法对黄连-栀子药对灌胃后的兔血浆进行测定,检出5个成分来源于黄连-栀子,其中包括盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、栀子苷以及栀子苷在体内β-葡萄糖苷酶作用下产生的代谢产物栀子素^[6]。这种方法虽然为药效物质基础的探讨作出了一定贡献,却忽视了药物之间的协同作用,依然停留在对中药成分化学结构的研究层面上。本实验以生物标记物为切

表 3 黄连栀子干预的热病证候模型阴离子生物标志物的化学信息

No.	t/min	m/z[M-H] ⁻		变化趋势	药物干预后 变化趋势	偏差 ΔmD	拟合度 i-FIT	推测化学式
		测量值	计算值					
1	3.03	195.040 1	195.040 6	↑	抑制上升	-0.5	0	C ₈ H ₇ O ₄ N ₂
2	3.01	241.045 6	241.046 1	↑	抑制上升	-0.5	0	C ₉ H ₉ O ₆ N ₂
3	3.01	258.037 8	258.036 2	↑	抑制上升	1.6	0	C ₈ H ₈ O ₇ N ₃
4	3.01	293.007 3	293.008 0	↑	抑制上升	-0.7	0.2	C ₈ H ₉ O ₈ N ₂ S
5	2.39	314.044 4	314.044 7	↑	抑制上升	-0.3	0.7	C ₁₁ H ₁₂ O ₆ N ₃ S
6	4.53	367.016 6	367.016 2	↑	抑制上升	0.4	0	C ₁₂ H ₇ O ₁₀ N ₄
7	0.43	383.042 4	383.042 2	↑	抑制上升	0.2	1.8	C ₇ H ₁₅ O ₁₆ N ₂
8	2.39	412.011 4	412.013 4	↑	抑制上升	-2	3.7	C ₁₂ H ₁₀ O ₆ N ₇ S ₂
9	1.29	444.074 6	444.074 7	↑	抑制上升	-0.1	0.8	C ₁₃ H ₂₂ O ₁₀ N ₃ S ₂
10	0.41	481.019 6	481.017 4	↑	抑制上升	2.2	0.2	C ₉ H ₁₃ H ₁₉ N ₄
11	1.22	481.075 9	481.076 4	↑	抑制上升	-0.5	0.9	C ₁₆ H ₂₁ O ₁₃ N ₂ S
12	2.39	548.037 0	548.038 2	↑	抑制上升	-1.2	0.9	C ₂₂ H ₁₄ O ₃ N ₉ S ₃

入点,其思想与中医理论整体观念相一致,阐明中药的整体效应,为药物协同作用的研究提供了创新思路。

5 结论

通过对黄连解毒汤中“君-使”药对黄连-栀子干预 2,4-二硝基苯酚热病证候模型后大鼠尿液的代谢组学研究,从机体内源性代谢产物变化角度,找出了 2,4-二硝基苯酚诱导的热病证候模型的生物标志物,此类内源性标志物可作为疾病诊断和药物筛选的依据。对黄连栀子药对干预 2,4-二硝基苯酚热病证候模型的作用进行了微观水平的评价,从对黄连栀子药对干预 2,4-二硝基苯酚热病证候模型的特异性生物标志物的变化规律分析得知,黄连栀子药对一些表现上升的标志物有明显的下调作用,且调节水平部分接近于空白组,说明黄连栀子药对这些标志物所处的代谢途径中某些环节作用特异性强。明确这些标志物的化学结构并寻找代谢途径,能阐明黄连栀子药对干预热病证候的实质,明晰黄

连栀子药对干预热病证候的性效关系。

[参考文献]

- [1] Fiehn O, Kopka J, Dormann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18 (11): 1157.
- [2] 卢芳,董培良,陈平平. 三种热病证候模型的最佳建模方法的探索和评价[J]. 山东中医杂志, 2009, 28 (2): 114.
- [3] 王惠文. 偏最小二乘方法及其应用[M]. 北京:国防工业出版社, 1999.
- [4] 王双,张永祥. 中药复方拆方研究的现状与分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(3): 56.
- [5] 李冀,李晓林. 论药对与方剂的配伍关系[J]. 中医药信息, 2005, 22(1): 30.
- [6] 王锐,郑晓璞,骆晶,等. “君-使”对药黄连-栀子兔血浆中相关成分的液相色谱-多级质谱联用分析[J]. 药物研究, 2009, 18(5): 5.

[责任编辑 邹晓翠]