

## 肉桂水提物对正常大鼠尿液代谢物组的影响

张启云<sup>1</sup>, 李冰涛<sup>1</sup>, 徐国良<sup>1</sup>, 孙立波<sup>1</sup>, 汤喜兰<sup>1</sup>, 黄丽萍<sup>2</sup>, 余日跃<sup>2</sup>, 刘红宁<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330006;

2. 江西中医学院药学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 研究肉桂水提物对大鼠尿液中内源性代谢产物的影响。方法: 肉桂水提物  $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  大鼠连续 ig 30 d, 收集 0, 1, 8, 15, 22, 29 d 尿样, LC-MS/MS 采集样品数据, 经主成分分析 (PCA), 正交信号校正偏最小二乘法判别分析 (OSC-PLS-DA) 处理数据, 结合生物标记物和相关资料, 分析肉桂水提物对大鼠内源性代谢产物的影响。结果: 肉桂水提物 ig 8 d 对大鼠尿液中内源性物质的影响最大。与空白组比较, 给药组尿样中 CPA [18 1(11Z) /0 0], Gamma-linolenyl carnitine 等物质浓度上升, Deoxyuridine, CerP (d18 1/22 0) 等物质浓度降低。结论: 肉桂水提物能显著影响大鼠体内与基础代谢和细胞信号相关物质的代谢。

[关键词] 肉桂; 代谢组学; 生物标记物

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0164-05

## Metabonomics Study on Urine of Normal Rats Administered with Cinnamomi Cortex Water Extract

ZHANG Qi-yun<sup>1</sup>, LI Bing-tao<sup>1</sup>, XU Guo-liang<sup>1</sup>, SUN Li-bo<sup>1</sup>, TANG Xi-lan<sup>1</sup>,  
HUANG Li-ping<sup>2</sup>, YU Ri-yue<sup>2</sup>, LIU Hong-ning<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the changes of endogenous metabolites concentrations in the urine of normal rats administered with Cinnamomi Cortex water extract. **Method:** The administered group were administered orally with Cinnamomi Cortex water extract for 30 days. Urine was collected at 0, 1, 8, 15, 22, 29 d after administration respectively and analyzed by LC/MS/MS. The acquired data were analyzed by PCA, OSC-PLS-DA. **Result:** After administration for 8 days, endogenous metabolites concentration in the urine of administered rats changed apparently. Through OSC-PLS-DA analysis, 21 biomarkers were found. The identified biochemical effects of these biomarkers were associated with the pharmacological actions of Cinnamomi Cortex, including increased concentrations of CPA (18 1(11Z) /0 0), gamma-linolenyl carnitine and decreased concentrations of deoxyuridine, CerP (d18 1/22 0). **Conclusion:** The administration of Cinnamomi Cortex water extract may change the cell signals and basic metabolism significantly in rat.

**[Key words]** Cinnamomi Cortex; metabonomics; biomarker

[收稿日期] 2010-04-06

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)基金项目  
(2006CB504702)

[通讯作者] \* 刘红宁, Tel: 0791-7118857, E-mail: lhongning@yahoo.com.cn

肉桂 Cinnamomi Cortex 系樟科植物肉桂树的干树皮, 为温里之要药, 肉桂成分复杂, 药理作用广泛, 对消化系统, 中枢神经系统, 心血管系统等均具有药理作用<sup>[1]</sup>, 但肉桂水提物口服后对内源性物质代谢的影响尚未有文献报道。本研究利用代谢组学方

法,通过对热性中药肉桂水提物给药大鼠尿样进行 LC/MS/MS 分析,得到尿液小分子代谢物图谱,结合主成分分析(PCA),正交信号校正偏最小二乘法判别分析(OSC-PLS-DA)处理数据途径,探讨肉桂水提物长期给药对正常大鼠内源性代谢物组变化的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 雄性大鼠,体重(220 ±20) g,江西中医药大学动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2006-0001。动物房温度(23 ±2) ℃,光照时间 12 h,给药期间大鼠自由进食,饮水。

**1.2 药材** 肉桂,广西东兴产,家种统装,购于北京鹤元堂医药科技有限公司,批号 20061003,经本实验室杨武亮教授鉴定为樟科植物肉桂树的干树皮。

**1.3 肉桂水提物制备** 肉桂水提物由本实验室提取。称取肉桂药材 0.4 kg,加 10 倍水浸泡 1 h,煎煮 1.5 h,倾出药液,残渣再加入 8 倍水,煎煮 1 h,合并 2 次药液,滤过、浓缩至含生药 0.45 g·mL<sup>-1</sup>,4 ℃ 放置备用。

**1.4 仪器** SIGMA3-18K 低温高速离心机(Sartorius, Germany); Agilent1200 6410 TripleQuadrupole 液质联用仪(Agilent Technologies, Germany);电子分析天平(Sartorius, Germany);去离子水;甲酸(Sigma-Aldrich, USA);乙腈(Tedia, USA);其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 大鼠随机分为空白组和给药组,每组 10 只。大鼠在本实验室适应 1 周后,开始给药。肉桂水提物含生药 0.3 g·kg<sup>-1</sup> ig 1 次/d,对照组按 1 mL·kg<sup>-1</sup> 给予蒸馏水,连续 30 d,自由摄食饮水。

**2.2 尿样的收集与处理** 分别于给药 0, 1, 8, 15, 22, 29 d 晨 9 00 将大鼠放置代谢笼,14 00 按组分别给药和水,收集药后 3 h 内尿液, -20 ℃ 保存。取 -20 ℃ 保存尿样,低温解冻后,13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取 0.5 mL 上清液,加入甲醇 0.5 mL,混匀,在 4 ℃ 下静置 3 h,4 ℃,18 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,进样。

## 2.3 LC/MS 数据的采集与处理

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse SB-C<sub>18</sub>(5 μm, 150 mm ×4.6 mm),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 ℃,运行 20 min。梯度洗脱条件 0 ~6 min (B: 100%), 6 ~8 min (B: 100% ~30%), 8 ~12 min (B: 30% ~10%), 12 ~14 min (B: 10%), 14 ~14.1 min (B: 10% ~100%), 14.1 ~15 min (B: 100%), 15 ~20 min (B: 100%)。

**2.3.2 质谱条件** 离子源模式 ESI 正离子模式;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 ℃。

**2.3.3 数据处理及标记物确定方法** 采集样品母离子 *m/z* 及 abund 值,以 Agilent Masshunter 进行峰识别,SQL Server(Microsoft, USA)进行峰匹配,匹配后数据转化为 Excel 格式,用于模式识别。SIMCA-P11.0(Umetrics AB, Umeå, Sweden)进行模式识别,正交信号校正(OSC)使用 SIMCA-P11.0 自带程序。正交信号校正办法:正交信号校正前使用 *parto* 做归一化处理,以类别做 *Y* 变量拟合 PLS 模型;正交信号校正过程中从特征值由大到小顺序删除与 *Y* 变量正交成分,至 OSC-PLS-DA 模型不存在过度拟合;建 OSC-PLS-DA 模型前处理使用中心化方法(*ctr*)进行归一化处理。从 OSC-PLS-DA 模型选取 VIP > 1,相关系数绝对值(|*P*(*coor*)|) > 0.75 的变量为潜在生物标记物候选变量,结合相关网站([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca))来确定生物标记物。

## 3 结果

**3.1 给药大鼠尿液总离子流图** 全扫描监测得尿液总离子流图(TIC),见图 1。反映尿液样品的化合物信息,从中提取质谱信息,*m/z* 值及相应的丰度(Abund)。

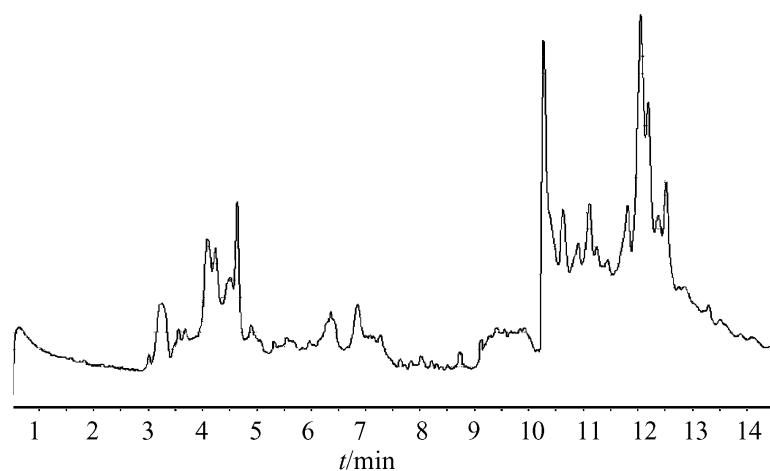


图 1 肉桂水提物给药大鼠尿液总离子流

**3.2 时间轨迹变化分析** 无督导的主成分分析方法无先验知识的条件下通过样本点在得分图上的分布反映样本的分类信息,结果具有客观性。由于尿液样品中内源性物质浓度差别较大,反映在质谱数据上浓度高的物质丰度值能达到数万的水平,浓度

低的物质只有几十,在数学模型中浓度高的物质权重系数较大,不利于低浓度生物标记物的发现,因此在建模型之前应对数据做归一化处理。

在不同时间点空白组与给药组均值得分图中,不同时间点 2 组均值得分点的距离的远近可以反映肉桂水提物对大鼠尿样中内源性物质的影响。图 2 是不同时间点空白组与给药组均值的主成分得分图,图中空白与给药组距离随给药时间变化呈现先增大后减小的趋势,给药 8 d 空白与给药组距离最远,即给药 8 d 肉桂水提物对大鼠尿液内源性物质代谢的影响达到最大。

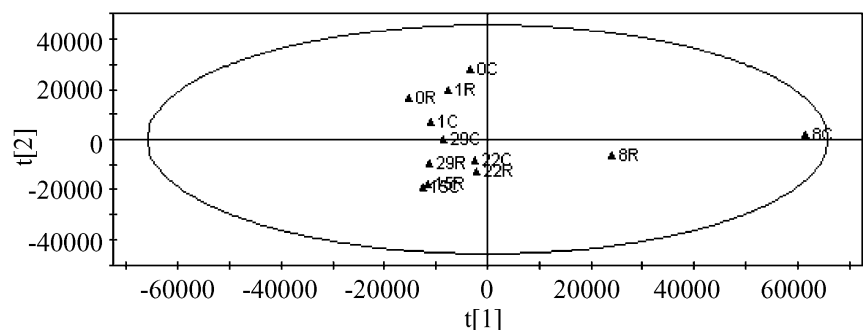


图 2 不同时间点空白给药组均值主成分得分

0, 1, 8, 15, 22, 29 为给药天数; C. 空白组; R. 给药组

**3.3 正交信号校正偏最小二乘法判别分析 (OSC-PLS-DA)** 正交信号校正能够删除与分类变量无关的数据信息,在本试验中可消除时间因素、样本个体差异等因素对数据的影响。在 PLS-DA 模型中,参数  $R^2Y$  反映模型对  $Y$  变量解释能力,  $R^2X$  反映模型对  $X$  变量解释能力,  $Q^2$  反映模型拟合程度,一般要求  $Q^2 > 0.5$ 。响应值排列检验 (Response Permutation

Test) 是用来检验数据模型是否存在过度拟合的方法,一般经过此检验后模型的  $R^2X$  截距  $< 0.4$ ,  $Q^2$  的截距  $< 0$ ,表明模型不存在过度拟合<sup>[2]</sup>。

给药 8 d 肉桂水提物对大鼠尿液内源性物质代谢的影响达到最大,对给药 8 d 尿液进一步处理,见图 3。

图 3a 中 2 组样本得分点没有重叠,表明肉桂水提物给药 8 d 2 组差异显著,肉桂水提物显著影响大鼠尿液中内源性物质的代谢,空白组样本点分布在第 1, 3 象限,其组内个体差异较大,PLS-DA 模型中  $R^2X = 0.724$ ,  $R^2Y = 0.731$ ,  $Q^2 = 0.708$ 。

图 3b 为模型经过信号校正后得分图,图中 2 组样本点按组别差异重合为一点。说明正交信号校正方法消除了噪音、样品个体差异对数据模型的影响。此时模型  $R^2X = 0.8476$ ,  $R^2Y = 1$ ,  $Q^2 = 1$ ,模型有效性检验结果显示  $R^2X = 0.0381$ ,  $Q^2 = -0.193$ ,即模型有效。同图 3a 模型相比,OSC-PLS-DA 模型解释变量信息能力和有效性显著提高。

图 3c 利用 Coomans Plot 对 OSC-PLS-DA 模型预测能力检验。图中红线是置信范围,空白组在第 2 象限,给药组在第 4 象限。第 1, 3 象限是未知类别样本。图中,一个空白样本被预测为未知类别,其他样本预测正确,共 20 个样本,即预测正确率为 99.5%,表明 OSC-PLS-DA 模型具有良好的预测能力。

图 3d 是 OSC-PLS-DA 模型的 U 形图。由模型重要性系数 (VIP) 和变量相关系数 ( $P(\text{corr})$ ) 组成。

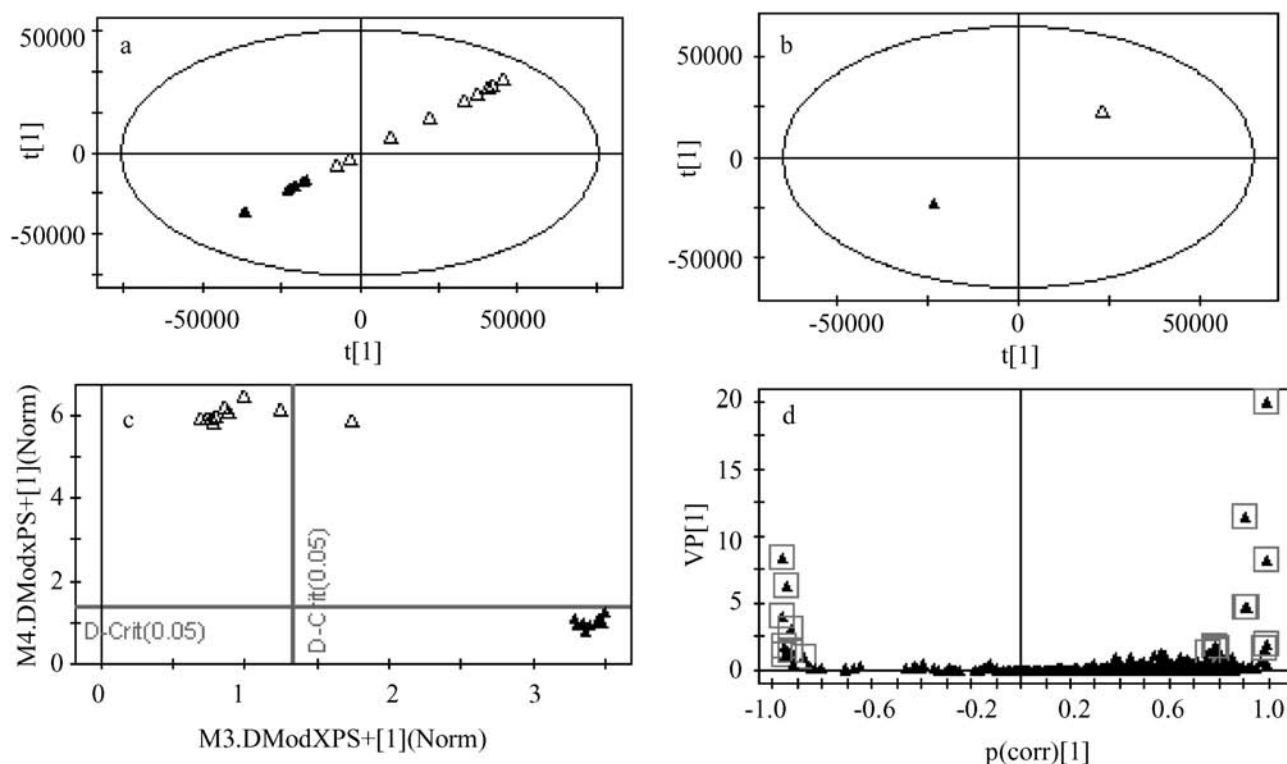


图 3 正交信号校正偏最小二乘法判别分析

a. 校正前 PLS-DA 得分; b. 校正后 PLS-DA 得分; c. Coomans plot; d. OSC-PLS-DA 的 U 形图;  
中变量可视为生物标记物; . 空白组; . 给药组

VIP 是反映变量对模型重要性的系数, VIP 值越大, 变量对模型越重要, 在 PLS-DA 模型中, VIP > 1 的变量被视为重要变量。相关性系数是描述 2 组变量相关性指标, 相关系数绝对值越大, 变量间相关性越大, 相关性大的变量组间差异也越显著, 在本试验中即空白组与给药组经 *t* 检验具有显著性差异。生物

标记物是能够代表性地反映生物体生理病理变化或外界环境刺激的内源性物质, 在 OSC-PLS-DA 模型上即是具有较好相关性的重要变量。根据经验满足 VIP > 1, P( *coor* ) > 0. 75 的变量能够满足成为生物标记物变量 ( *m/z* 值 ) 的要求。通过查找相关网站, 初步判定生物标记物如表 1 所示。

表 1 肉桂水提物给药大鼠尿液的生物标记物

变量	coeff	VIP	趋势	物质	生物功能
814.7	- 0. 957 7	8. 295 4	上升	PE[ P-18 1( 11Z ) /24 0]	细胞膜成分, 细胞信号
397	- 0. 946 6	6. 279 1	上升	ergosterol	维生素 D2 的前体物质
815.7	- 0. 958 6	4. 059 9	上升	SM[ d18 0/24 1( 15Z ) ]	细胞膜成分, 细胞信号
792.7	- 0. 929 5	3. 092 7	上升	PC[ 20 4( 5Z, 8Z, 11Z, 14Z ) /P- 18 1( 11Z ) ]	细胞膜成分, 细胞信号
352.4	- 0. 951 8	1. 680 4	上升	未确定	
793.8	- 0. 924 6	1. 472 4	上升	PG[ 16 1( 9Z ) /22 6( 4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z ) ]	细胞膜成分, 细胞信号
408	- 0. 941 1	1. 131 8	上升	gamma-linolenyl carnitine	脂肪代谢, 降血脂
816.7	- 0. 950 7	1. 080 4	上升	PC[ 16 1( 9Z ) /22 0]	细胞膜成分, 细胞信号
419.1	- 0. 876 8	0. 950 6	上升	CPA[ 18 1( 11Z ) /0 0]	细胞膜成分, 细胞信号
701.6	0. 992 2	19. 964 6	下降	PA[ 18 0/18 2( 9Z, 12Z ) ]	细胞膜成分, 细胞信号
679.6	0. 903 7	11. 492 9	下降	DG[ 20 0/20 1( 11Z ) /0 0]	细胞膜成分, 细胞信号
702.7	0. 992 4	8. 286 1	下降	CerP( d18 1/22 0)	细胞膜成分, 细胞信号
680.7	0. 911 6	4. 723 5	下降	PS( 14 0/14 0)	细胞膜成分, 细胞信号
340.3	0. 902 6	4. 58 4	下降	5-hydroxy-6-methoxyindole glucuronide	肾分泌的毒性物质
703.5	0. 992 5	1. 963	下降	DG[ 20 1( 11Z ) /22 2( 13Z, 16Z ) /0 0]	细胞膜成分, 细胞信号
717.5	0. 982 7	1. 656 5	下降	DG[ 22 5( 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z ) /22 5( 4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z ) /0 0]	细胞膜成分, 细胞信号
588.5	0. 781 6	1. 825 8	下降	<i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosaminyldiphosphodolichol	
114.1	0. 793 8	1. 596 4	下降	1-pyrroline-5-carboxylic acid	氨基酸, 尿循环, 三羧酸循环代谢产物
229.2	0. 797 3	1. 375 4	下降	deoxyuridine	抗基础代谢
566.5	0. 760 7	1. 316 9	下降	ceramide ( d18 1/18 0)	前列腺素, 白细胞介素代谢成分
245.1	0. 808 1	1. 044 9	下降	n1-acetylspemine	精胺转化为亚精胺的中间体, 精胺转化成 NO

#### 4 讨论

本试验运用 LC/MS/MS 的代谢组学方法初步研究了肉桂水提物对 SD 大鼠尿液中内源性代谢产物的影响, 并运用正交信号校正偏最小二乘法判别分析初步查找和确定了大鼠 ig 肉桂后尿液内源性生物标记物。经初步研究, 肉桂水提物显著影响大鼠细胞信号物质的代谢。我们初步判定了 21 种生物标记物, 有 12 种是细胞信号物质。一些细胞信号

物质在生理和病理方面发挥重要作用。如 CerP( d18 1/22 0) 能够通过激活和易位磷酸酯酶 A2 的活性, 专属性地诱导花生四烯酸和前列腺素的合成; 在研究过程中发现高良姜也能使大鼠 CerP( d18 1/22 0) 浓度显著降低, 而高良姜抗炎作用机制是通过抑制前列腺素合成酶系和磷酸酯酶 A2 活性发挥抗炎镇痛作用<sup>[3]</sup>, 由此可推测肉桂抗炎作用机制可能

( 下转第 171 页 )

的释放,白细胞聚集减少,抑制了炎症反应,对心、肝、肾等重要脏器有一定的保护作用。有趣的是,同时对于迷走神经切断联合烟碱治疗的大鼠促炎症效应被部分抵消,证实了烟碱在次要的胆碱能抗炎通路中的作用不依赖于迷走神经的完整性,可独立发挥作用,但其作用机制还有待进一步从分子或基因水平来深入研究。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Moggi C, Memmini G, Turini M, et al. Severe inflammatory disease in children. Rationale for corticosteroid immunomodulating therapy: pathogenic therapy[ J ]. *Pediatr Med Chir*, 1996, 18( 4 ) : 395.
- [ 2 ] Bone R C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS [ J ]. *Crit Care Med*, 1996, 24( 7 ) : 1125.
- [ 3 ] Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome[ J ]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 216: 167.
- [ 4 ] 张银中, 叶铁虎, 赵丽云, 等. 白介素-6 和白介素-10 对体外中性粒细胞凋亡的影响[ J ]. *武警医学*, 2004, ( 9 ) : 647.
- [ 5 ] Tracsy K J. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway[ J ]. *Clin Invest*, 2007, 117( 2 ) : 289.

- [ 6 ] Guarini S, Altavilla D, Cainazzo M M, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- $\kappa$ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock[ J ]. *Circulation*, 2003, 107( 8 ) : 1189.
- [ 7 ] Van W D J, Giebelen I A, Florquin S, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis [ J ]. *J Infect Dis*, 2005, 191( 12 ) : 2138.
- [ 8 ] Bwmik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition og tumor necrosis foctor during ischemia reperfusion[ J ]. *J Vase Surg*, 2002, 36( 6 ) : 1231.
- [ 9 ] Bemik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Phamacological stimulation of the choline anti-inflammatory pathway[ J ]. *J Exp Med*, 2002, 195( 6 ) : 1.
- [ 10 ] Rorovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[ J ]. *Nature*, 2000, 405( 6785 ) : 458.
- [ 11 ] Yao Y M, Sheng Z Y, Huang L F. The effect of a novel cytokine, high mobility group box 1 protein, on the development of traumatic sepsis[ J ]. *Clin J Integr Med*, 2009, 15( 1 ) : 13.

[责任编辑 何伟]

(上接第 167 页)

与高良姜相同; CPA[ 18 1( 11Z ) / 0 0 ] 具有阻止癌细胞入侵和扩散的作用, 而肉桂具有抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>。肉桂水提物提高 CPA[ 18 1( 11Z ) / 0 0 ] 在尿液中浓度, 可能与肉桂抗肿瘤作用机制相关。肉桂增强基础代谢的作用机制可能与内源性抗基础代谢物质的浓度降低相关。本试验研究证明肉桂水提物能使给药组抗基础代谢物质( deoxyuridine) 的浓度显著低于空白组。而文献报道热性药物能够使机体基础代谢率显著升高<sup>[4]</sup>, 与试验过程中 deoxyuridine 浓度显著降低一致。因此, 抗基础代谢物质浓度降低可能是肉桂增强基础代谢的作用机制。

综上, 本试验以 LC-MS/MS 的代谢组学方法研究了肉桂水提物给药对大鼠尿液中内源性物质的影响, 初步研究结果表明肉桂水提物能显著影响大鼠

尿液中与细胞信号、基础代谢等作用相关物质的浓度变化。但具体的机制尚不明确, 有待进一步的分析或试验研究。

#### [参考文献]

- [ 1 ] 方琴. 肉桂的研究进展 [ J ]. *中药新药与临床药理*, 2007, 3( 18 ) : 249.
- [ 2 ] www.umetrics.com.
- [ 3 ] Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, et al. Inhibition of prostglandian and leukotriene biosythesis by gingerols and diarylheptanoids[ J ]. *Chem Pharm Bull Tokyo*, 1992, 40 ( 2 ) : 387.
- [ 4 ] 严守正. 虚热[ J ]. *福建中医药*, 1963, 8( 2 ) : 71.

[责任编辑 何伟]