

花椒水提物给药大鼠尿液代谢组学研究

汤喜兰¹, 徐国良¹, 李冰涛¹, 张启云¹, 孙立波¹, 黄丽萍², 余日跃², 刘红宁^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究花椒水提物给药对大鼠尿样中内源性代谢产物的影响。方法: 花椒水提物按 $0.3428\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给 SD 大鼠连续 ig 30 d, 收集尿样, 通过 Agilent1200 6410 三重四极杆质谱对尿液中内源性代谢物进行全扫描分析, SIMCA-P 软件经过正交信号校正偏最小二乘法差别分析(OSC-PLS-DA)数据。结果: 均值主成分分析结果显示花椒水提物给药 15 d 对尿样代谢产物的影响最大。与空白组相比, 给药组大鼠尿样中 cytidine, decanoylcarnitine, N-acetylglucosamine 6-phosphate 等物质发生显著变化。结论: 花椒水提物显著影响大鼠尿样中与抗肿瘤、镇痛、降血脂等药理作用相关物质的代谢, 为进一步阐释花椒药性的研究工作提供了依据。

[关键词] 代谢组学; 花椒; 生物标记物

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0127-04

Metabonomics Study on the Urine in Rat Treated by Water Extract of *Zanthoxylum chinifolium Siebet Zucc*

TANG Xi-lan¹, XU Guo-liang¹, LI Bing-tao¹, ZHANG Qi-yun¹,
SUN Li-bo¹, HUANG Li-ping², YU Ri-yue², LIU Hong-ning^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** HPLC/MS/MS-based study on the changes of endogenous metabolites of Sprague-Dawley Rats administrated with water extract of *Zanthoxylum chinifolium Siebet Zucc*. **Method:** Ten Sprague-Dawley rats were successively administrated with *Zanthoxylum chinifolium Siebet Zucc* water extract ($0.3428\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) for 30 days. Agilent1200 6410 Triple Quadrupole mass spectrometer was used for the analysis of endogenous metabolites in rat urine samples. These data were analyzed by OSC-PLS-DA. **Result:** The difference in metabolic profiles between the control group and the dosed group was well observed by OSC-PLS-DA analysis after administration of 15 days, 31 biomarkers were found, such as cytidine, decanoylcarnitine and N-acetylglucosamine 6-phosphate. **Conclusion:** The administration of *Zanthoxylum chinifolium Siebet Zucc* water extract could influence concentrations of endogenous metabolites related to anticancer, analgesic and hypolipidemic pharmacological actions. This work can provide basis for further researches on the interpretation of drug property of evodiae.

[Key words] metabonomics; *Zanthoxylum chinifolium Siebet Zucc*; biomarkers

[收稿日期] 2009-09-15

[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

代谢组学技术是上世纪 90 年代中期兴起的一门定量测量生物体因病理生理刺激或基因改变引起的代谢应答变化, 将机体的代谢过程与微生物代谢及外源环境因子的相互作用因素综合起来的系统生物学技术^[1]。中药具有成分复杂、作用靶点多的特

点,这是制约中药发展的一个瓶颈,同时也是中药发展的机遇。代谢组学技术从代谢网络终端表象的整体角度反映生物体功能状态或外界刺激对生物体影响,进一步研究外源性刺激对机体影响的靶点和作用机理,为中药研究提供了新的研究思路和方法^[2]。

花椒系芸香科植物青椒 (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc) 的干燥成熟果皮,为常用温里药。现代研究表明国内外花椒属植物的化学成分主要有生物碱、酰胺、木脂素、香豆素、挥发油和脂肪酸等,对心血管系统、消化系统、免疫机能、镇痛、镇静、抗炎、局部麻醉、抑菌和杀疥螨作用及抗肿瘤等方面均有较强的药理活性^[3],花椒对机体代谢产物的影响尚未有文献报道。本实验使用 LC/MS/MS 的代谢组学技术结合正交信号校正偏最小二乘法差别分析(OSC-PLS-DA)的模式识别方法研究花椒水提物对大鼠内源性代谢产物影响,为花椒作用机制和药性研究奠定基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 花椒药材,广西东兴产,家种统装,产品批号 20061003,花椒水提物由本实验室提取,浓缩至 $0.3428 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。去离子水;甲酸(Fluka, USA);乙腈(TD, USA);其他试剂均为分析纯。

1.2 动物 SD 雄性大鼠,体重(220 ± 20) g,由江西中医学院动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2006-0001。

1.3 仪器与软件 SIGMA3-18K 低温高速离心机(Sartorius, Germany), Agilent1200 6410 TripleQuadrupole 质谱仪(Agilent Technologies, USA),电子分析天平(Sartorius, Germany)。SIMCA-P11.0 (UmetricsAB, Sweden), SQL Server (Microsoft, USA), SPSS 13.0(SPSS. inc, USA)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 随机分为空白组和给药组,每组 10 只。大鼠预适应 1 周后开始给药,1 次/d,每天 14:00 空白组 ig 蒸馏水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药组 ig 花椒水提物 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 30 d,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。

2.2 尿样的收集与预处理 分别于给药后 0, 1, 8, 15, 22, 29 d 早晨 9:00 将大鼠置于代谢笼,收集给药后 3 h 内尿液, -20 保存。样品预处理过程如下:取 -20 保存尿样,低温解冻,4 , $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,

离心 5 min,取上清液 0.5 mL,加入甲醇 0.5 mL,混匀,4 静置 3 h,4 , $18\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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-C₁₈(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm);流动相乙腈(A)、0.1% 甲酸(B);流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 15 μL ;柱温 35 。运行 20 min。梯度洗脱条件如表 1。

表 1 色谱条件

Time/min	A/%	B/%
0	0	100
6	0	100
8	70	30
12	90	10
14	90	10
14.1	0	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 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,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 进行峰匹配,匹配后数据转化为 excel 格式,用于模式识别。SIMCA-P 11.0 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 对数据做归一化处理,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,至正交信号校正后偏最小二乘法判别分析(OSC-PLS-DA)模型不存在过度拟合;OSC-PLS-DA 模型前处理使用中心化方法进行归一化处理。从 OSC-PLS-DA 模型选取 $VIP > 1$,相关系数绝对值($|P(\text{cor})|$)大于 0.75 并经独立样本 t 检验具有显著差异变量为生物标记物变量,结合相关网站(hmdb.ca),初步确定生物标记物。

3 结果

3.1 时间轨迹分析 无督导的主成分分析方法在无先验知识的情况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。尿样中不同的代谢产物浓度差别较大,浓度高的物质在数据模型中的权重大,这样不利于低浓度生物标记物的发现,因此在模型拟合前应对数据做归一化处理,以利于发现低浓度生物标记物。

在不同时间点主成分分析得分图中,不同时间点两组均值得分点距离的远近能够反映花椒水提物

在不同时间点对尿液中内源性代谢产物的影响。图 1 为主成分得分图,在主成分分析前使用 pareto 方法对原数据做归一化处理。图中各时间数据得分点不重合,空白组与给药组得分点距离不相等;6 个时间点空白组与给药组得分点之间距离具有先缩小后扩

大的趋势,至用药 15 d 空白组与给药组样本点距离小于其他用药各天距离。说明时间和花椒水提物用药均是影响内源性物质代谢的重要因素;15 d 花椒水提物对大鼠尿液中内源性物质的影响最大。

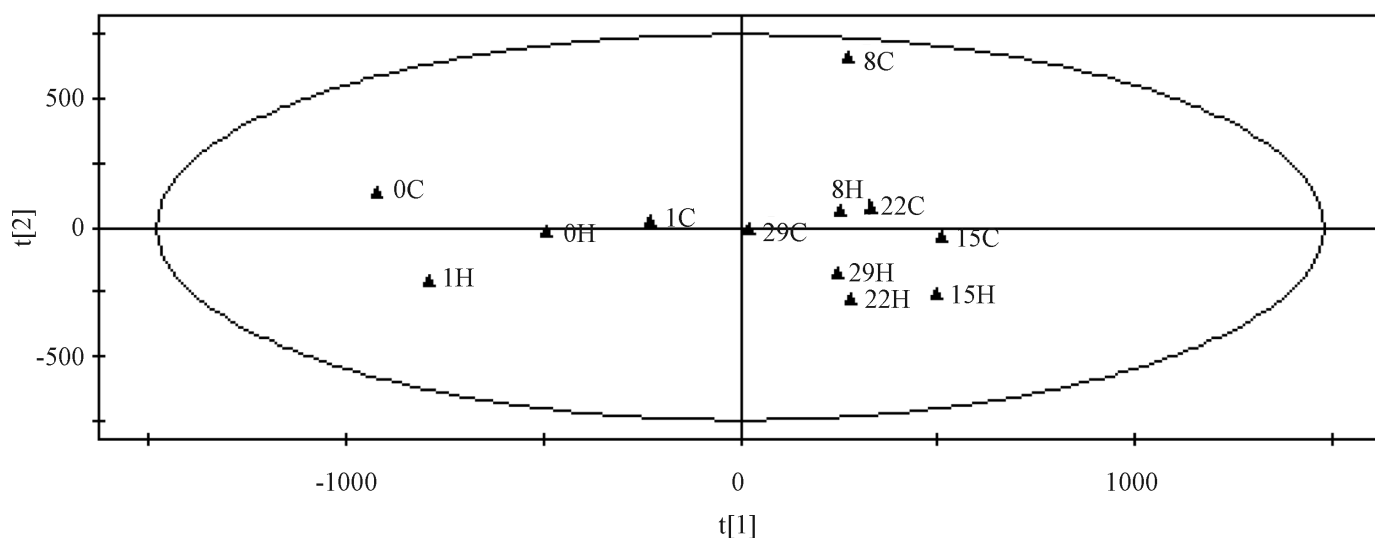


图 1 不同时间点空白与给药组均值主成分分析
0, 1, 8, 15, 22, 29 为给药天数;C. 空白组;H. 给药组

3.2 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,在本实验中即是消除时间因素、噪音、个体差异等因素对数据模型的影响。偏最小二乘法的判别分析的参数 R^2Y 反映模型能够解释多少变量,而 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现象的方法,一般经过此检验后模型的 R^2X 截距 < 0.4 , Q^2 的截距 < 0 ,说明模型不存在过度拟合现象。

图 2a 中两组样本得分点没有重叠,说明花椒水提物用药 15 d 两组差异显著,花椒水提物显著影响代谢产物变化;同时给药组内样本点分布较为分散,说明给药组内差异较大。PLS-DA 模型中重要参数

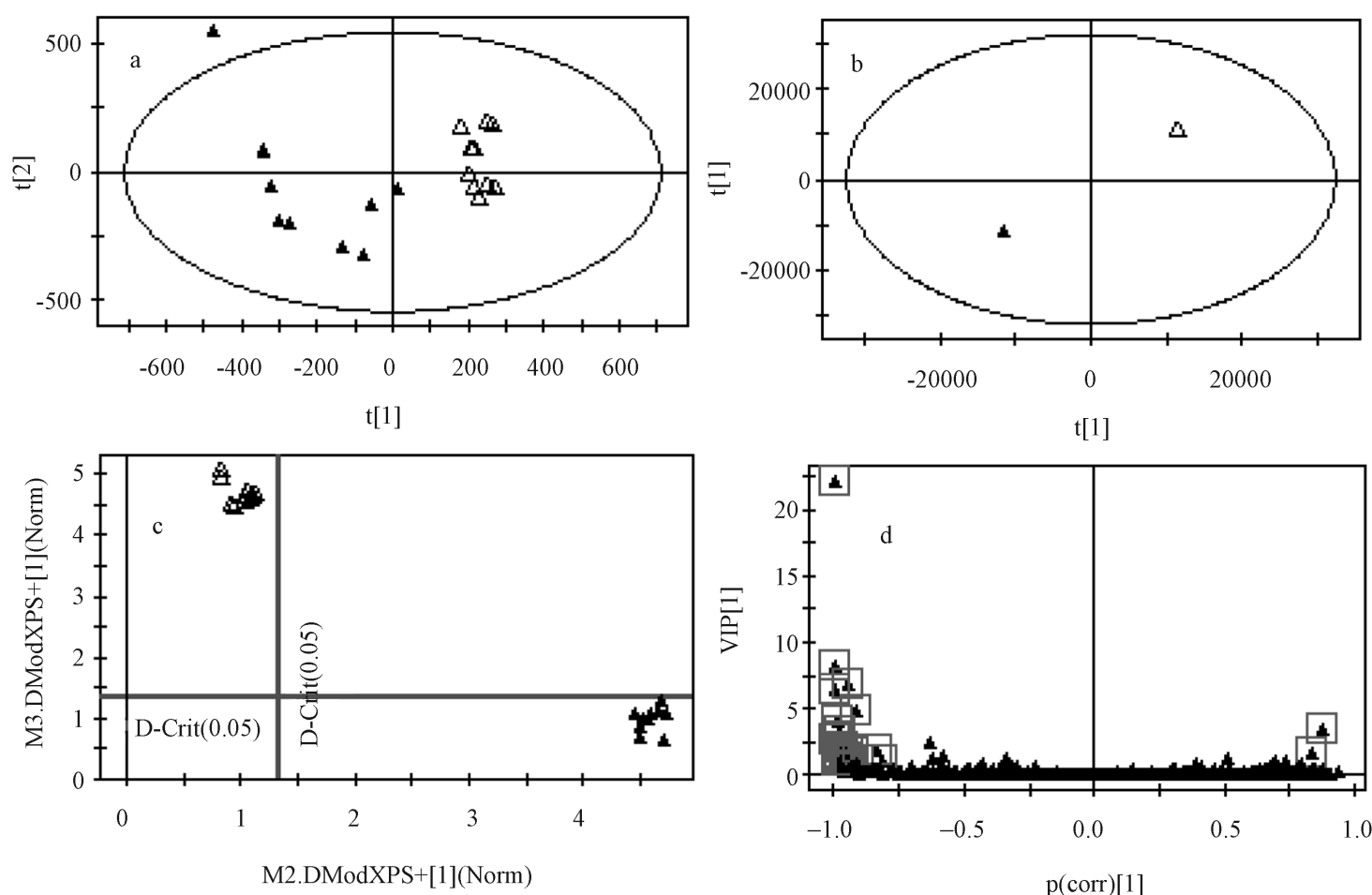


图 2 a. 正交信号校正前 PLS-DA 得分图;b. 正交信号校正后 PLS-DA 得分图;c. Cooman plot;d. OSC-PLS-DA 的 U 形图
内的变量可以被视为生物标记物。图 2a, 2b, 2c 中 为给药组 为空白组。

$R^2X = 0.928$, $R^2Y = 0.994$, $Q^2 = 0.954$, 但模型的响应排列检验结果显示 R^2X 的截距均为 0.835, > 0.4, 说明模型存在过度拟合现象。

图 2b 模型经过信号校正后得分图, 图中两组样本点按组别差异重合为一点。说明偏最小二乘法正交信号校正方法消除了噪音、外源性物质、个体差异等与分类变量无关的数据对模型的影响。此时模型只有一个有效主成分, $R^2X = 0.787$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 1$, 模型有效性检验结果显示模型不存在过度拟合现象。

图 2c Coomans plot 对 OSC-PLS-DA 模型的预测能力检验, 检验结果显示空白组与给药组归类正确, 正确率为 100%, 即通过 OSC 后建立的 PLS-DA 模型预测能力好。

图 2d 是 OSC-PLS-DA 模型的 U 形图, 图由模型

重要性系数 (VIP) 和变量相关系数 ($P(\text{cor})$) 两个变量组成。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 $VIP > 1$ 的变量被视为模型的重要变量。相关系数性系数是描述两组变量相关性指标, 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, 在本实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 $VIP > 1$, $|P(\text{cor})| > 0.75$ 的变量能够满足生物标记物变量 (m/z 值) 的要求。结合相关网站 (hmdb.ca) 判定生物标记物, 初步确定以下物质为花椒可能生物标记物 (表 2)。

表 2 给药组部分可能生物标记物

变量	相关系数	VIP	趋势	可能物质	相关作用
102.1	0.8803	3.4697	下降	未知	未知
130.1	-0.8368	1.9559	上升	Pyrolidonecarboxylic acid	GABA 样作用, 降血压
154.1	-0.982	1.4898	上升	Dopamine	扩张血管, 降血压
198.1	-0.9048	1.1161	上升	L-Dopa	强心
212.2	-0.9388	6.9074	上升	Methyldopa	降血压
244	-0.9679	2.0703	上升	Cytidine	抗肿瘤
278.1	-0.9737	1.1313	上升	DOPA sulfate	扩张血管, 降血压
302.2	-0.973	1.2197	上升	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	镇痛
308.2	-0.9191	1.6479	上升	Iodotyrosine	提高神经兴奋性
316.2	-0.9474	1.7981	上升	Decanoylcarnitine	促进脂肪氧化
322.2	-0.9697	2.8904	上升	Clopidogrel	抗血小板
368.2	-0.929	1.1267	上升	3-O-fucopyranosyl-2-acetamido-2-deoxyglucopyranose	增强免疫力

4 讨论

该实验利用代谢组学的原理, 结合化学计量学的方法初步探讨了花椒水提物对大鼠内源性代谢产物的影响, 初步判定部分可能生物标记物。经过对这些生物标记物的研究得出以下结论:

花椒水提物对大鼠的心血管、甲状腺系统及中枢神经系统同时作用, 通过 LC/MS/MS 判定的生物标记物包括: Clopidogrel 具有抗血小板的作用, Iodotyrosine 是一种重要甲状腺素的前体物质, Dopamine 等分别对心血管, 甲状腺系统及中枢神经系统起作用。

花椒水提物对 SD 大鼠与抗肿瘤, 促进脂肪氧

化, 镇痛作用相关的内源性物质的代谢有显著影响。本研究实验结果表明 Cytidine 具有抗肿瘤的作用; Decanoylcarnitine 具有促进脂肪氧化的作用, 可能是与花椒降血脂相关的内源性物质; N-Acetylglucosamine 6-phosphate 是一种具有镇痛作用的内源性物质。试验结果表明以上物质在花椒水提物用药 15 d, 给药组大鼠尿样中的含量显著高于空白组, 与花椒抗肿瘤, 镇痛, 降血脂的药理作用一致^[4-6], 对这些物质的进一步研究可能有助于解释花椒作用的机制。

综上所述, 该实验使用 LC/MS/MS 的代谢组学方法研究花椒水提物 ig 用药大鼠尿液中小分子物