

· 药物代谢 ·

# 穿山龙提取物抗急性痛风性关节炎的尿液代谢组学分析

于栋华, 宋明洋, 王霄阳, 周琦, 于纯森\*  
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:** 对急性痛风性关节炎大鼠给予穿山龙提取物后的尿液代谢组学进行研究, 寻找相关的潜在生物标志物及相关代谢通路。**方法:** 采用尿酸钠 (MSU) 诱导的急性痛风性关节炎大鼠模型, 将 SD 大鼠 40 只随机分为空白组、穿山龙提取物组、模型组、穿山龙提取物干预组, 每组 10 只。给药组灌胃给予穿山龙提取物, 给药剂量  $0.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每天 1 次, 连续 5 d, 于末次给药后, 收集大鼠尿液, 运用 UPLC-Q-TOF/MS 结合模式识别方法分析, 采用正、负离子扫描模式下电喷雾离子源, 数据采集范围  $m/z$  100 ~ 1 500, 采用全扫描方式。**结果:** 鉴别出了 12 个共同的潜在生物标志物, 分别为肌氨酸, 二甲基甘氨酸, 脱氧胞苷, 尿酸, 5-HT, L-胱硫醚, 4-吡哆酸, 脱氧尿苷, 褪黑激素, 5-甲氧基色胺, 富马酸和胞苷。与空白组比较, 穿山龙提取物组中这 12 个潜在生物标志物均明显下调; 与模型组比较, 在穿山龙提取物干预组的潜在生物标志物中, 有 10 个上调, 2 个下调, 穿山龙提取物对肌氨酸, 尿酸, L-胱硫醚, 4-吡哆酸, 脱氧尿苷, 5-甲氧基色胺, 胞苷, 二甲基甘氨酸, 褪黑激素, 富马酸这 10 个标志物均表现出了纠正异常表达的趋势; 与急性痛风性关节炎相关性最强的代谢通路为半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、色氨酸代谢。**结论:** 穿山龙提取物可能是通过促进半胱氨酸和甲硫氨酸代谢中胱硫醚向半胱氨酸的转化水平, 上调色氨酸代谢中褪黑激素, 实现对痛风性关节炎的防治作用。

**[关键词]** 穿山龙提取物; 尿酸钠; 急性痛风性关节炎; 尿液代谢组学; 半胱氨酸和甲硫氨酸代谢; 色氨酸代谢; L-胱硫醚

**[中图分类号]** R22; R684.3; R28; C37; R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0130-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192346

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190807.1105.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-08-07 14:54

## Analysis on Urine Metabolomics of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma Extract Against Acute Gouty Arthritis

YU Dong-hua, SONG Ming-yang, WANG Xiao-yang, ZHOU Qi, YU Chun-miao\*  
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma extract (DNRe) on rats with acute gouty arthritis (AGA) based on urine metabolomics and to search for the related potential biomarkers and metabolic pathways. **Method:** Rat model of AGA induced by monosodium urate (MSU) was selected, 40 rats were randomly divided into the blank group (k), the DNRe group (g), the model group (m), and the DNRe treatment group (gm), with 10 rats in each group. The drug-administered group was administered with DNRe at a dose of  $0.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  once a day for 5 days. The urine was gathered after the last administration, and analyzed with UPLC-Q-TOF/MS coupled with pattern recognition techniques, electrospray ionization (ESI) under positive and negative ion scanning mode was adopted, data collection range was  $m/z$  100-1 500 with full scanning mode.

**[收稿日期]** 20190604(015)

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2016058);国家自然科学基金项目(81803871);黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q18121);哈尔滨市应用技术与开发项目(青年后备人才B类)(404s241);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(051599)

**[第一作者]** 于栋华, 博士, 副研究员, 从事中药药性理论及药效物质基础研究, E-mail: yudonghua1015@163.com

**[通信作者]** \*于纯森, 博士, 副教授, 从事中药保健食品研制与开发工作, E-mail: miao911@sina.com

**Result:** A total of 12 common potential biomarkers were identified as sarcosine, dimethylglycine, deoxycytidine, uric acid, 5-hydroxytryptamine (5-HT), *L*-cystathionine, 4-pyridoxic acid, deoxyuridine, melatonin, 5-methoxytryptamine, fumaric acid and cytidine. Compared with the blank group, the 12 potential biomarkers in the DNRe group were significantly down-regulated. Compare with the model group, 10 metabolites were up-regulated and 2 metabolites were down-regulated in the 12 potential biomarkers of the DNRe treatment group, the abnormal expression of 10 markers including sarcosine, uric acid, *L*-cystathionine, 4-pyridoxic acid, deoxyuridine, 5-methoxytryptamine, cytidine, dimethylglycine, melatonin, fumaric acid could be modulated by DNRe. The strongest metabolic pathways associated with AGA were cysteine and methionine metabolism, and tryptophan metabolism. **Conclusion:** The effect of DNRe on AGA may be related to the promotion of conversion level from cystathionine to cysteine in the cysteine and methionine metabolism, and the up-regulating melatonin level in tryptophan metabolism.

**[Key words]** Dioscoreae Nipponicae Rhizoma extract (DNRe); monosodium urate; acute gouty arthritis; urine metabolomics; cysteine and methionine metabolism; tryptophan metabolism; *L*-cystathionine

穿山龙作为传统中药材,在我国具有几千年的应用历史。临床中常用于风湿痹病、关节肿胀、疼痛麻木等<sup>[1]</sup>。现代研究发现,穿山龙的根茎中主要为甾体皂苷类成分,具有抗炎<sup>[2]</sup>、调节免疫<sup>[3]</sup>、降尿酸<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等作用。本课题组前期研究表明,穿山龙提取物对痛风性关节炎及高尿酸血症均有治疗作用<sup>[6]</sup>。

中药虽然疗效确切,但多成分、多靶点、多途径的特点,使得其有效成分及作用机制并不十分明确,而代谢组学是后基因组学时代最重要的组学技术之一,亦是最重要的系统生物学技术,借助于代谢组学技术有助于阐明中药的作用机制和处方配伍治疗疾病时的内在规律。本实验拟采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术,检测给予穿山龙提取物干预后正常及病理模型状态下大鼠的尿液代谢组学变化,寻找其潜在的生物标志物,以助于阐明急性痛风性关节炎的病理机制及作用机制。

## 1 材料

Xevo G2-XS QToF 型超高液相色谱-飞行时间-质谱仪(美国沃特斯公司,包括 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)。穿山龙提取物由黑龙江中医药大学三级毒理学实验室按课题组前期方法制备<sup>[7]</sup>,亮氨酸脑啡肽和尿酸钠(MSU)结晶(美国西格玛奥德里奇公司,批号分别为 L1011,108K5310),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲酸、甲醇为色谱级,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 雄性大鼠,体质量(180 ± 20)g, SPF 级,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黑)2013-004,饲养于黑龙江中医药大学

实验动物中心屏障系统中。本文涉及的动物实验符合黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会的要求,批准号 2018032501。

## 2 方法与结果

**2.1 模型的制备**<sup>[8]</sup> 用灭菌后的水配制 0.025 g·mL<sup>-1</sup> MSU 混悬液,第 3 天给药 1 h 后,仰卧位固定麻醉大鼠,将其膝关节轻度的弯曲,一次性用 6 号针头将 MSU 混悬液 0.2 mL 注射入大鼠膝关节髌上韧带(插入时有落空感即为注射成功),造成急性痛风性关节炎模型。

**2.2 分组及给药**<sup>[9]</sup> 将 SD 大鼠 40 只,随机分为空白组(k),穿山龙提取物组(g),模型组(m),穿山龙提取物干预组(gm),每组 10 只(穿山龙提取物组为正常大鼠给药组,穿山龙提取物干预组为模型大鼠给药组)。穿山龙提取物组和穿山龙提取物干预组灌胃给予穿山龙提取物,给药剂量 0.48 g·kg<sup>-1</sup>,每天 1 次,连续 5 d。空白组和模型组给予等体积生理盐水,每天 1 次,连续 5 d。

**2.3 尿液样本的收集与制备** 于末次给药 24 h 后,收集大鼠尿液,低温离心机离心 15 min(4 ℃, 13 000 r·min<sup>-1</sup>),移液枪移出上清液至新的离心管中,同等条件下再离心 1 次,得样本, -80 ℃ 冰箱冻存,用时室温复融,将样本移到液相瓶中,进样量 3 μL。

## 2.4 尿液分析的检测条件

**2.4.1 色谱条件** ACQUITY® UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,平衡时间 10 min,流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 2.5 min, 1% ~ 10% A; 2.5 ~ 3.5 min, 10% ~ 40% A, 3.5 ~ 11 min,

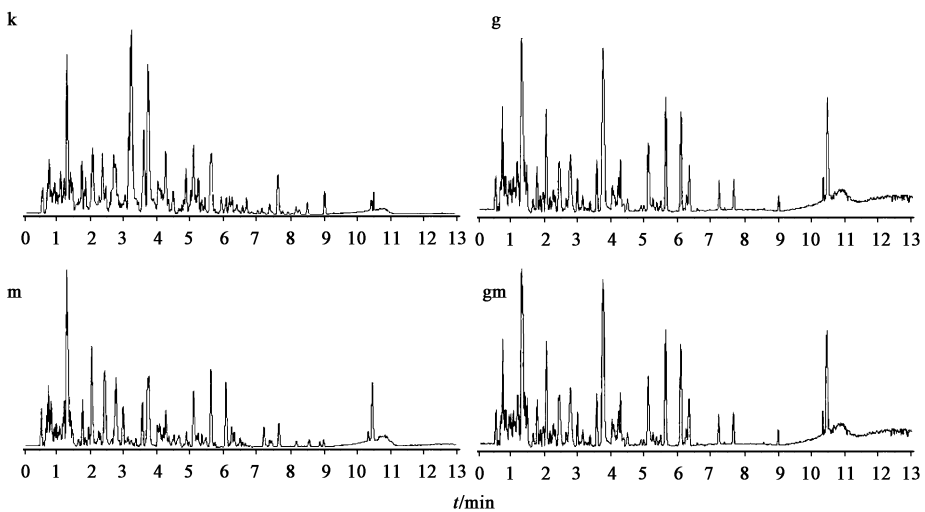
40% ~ 70% A, 11 ~ 12 min, 70% ~ 80% A, 12 ~ 13 min, 80% ~ 100% A), 柱温 40 ℃。

**2.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),采用正、负离子模式进行检测。正离子模式下条件为毛细管电压 1.3 kV,样品锥孔电压 60 V,离子源温度 110 ℃,脱溶剂温度 350 ℃,脱溶剂氮气流量和锥孔气流量均为 20 L·h<sup>-1</sup>。负离子模式下条件为毛细管电压 1.5 kV,样品锥孔电压 70 V,离子源温度、脱溶剂温度、脱溶剂氮气流量和锥孔气流量均同正离子模式。采用亮氨酸脑啡肽在线质量校正,校正系统采用美国沃特世公司 LockSpray™,锁定质量浓度为 1.0 μg·L<sup>-1</sup>,流速 30 μL·min<sup>-1</sup>。数据采集范围 *m/z* 100 ~ 1 500,采用全扫描方式。

**2.4.3 多元统计分析及潜在生物标志物鉴定** 将处理好的尿液数据输入 Progenesis QI 软件进行分析,结合 EZinfo 2.0 软件,将尿液数据进行主成分分析(PCA),正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)处理,绘制的主成分得分图(S-plot)可对比各组间的离散度,结合各组之间各离子聚集点的变化趋势,在同一标准下鉴定出具有明显差异性的表达代谢物,筛选变量重要性投影(VIP)值 > 1 且 *P* < 0.05 的离子作为生物标志物,在人类代谢组数据库

(HMDB)中搜索,在京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库中找到对应的代谢通路,通过查找文献进行分析并排除外源性生物标志物,全面诠释生物标志物的生物学意义,最终找到与所研究疾病相关的差异代谢物及代谢通路。

**2.5 尿液代谢组学的初步分析** 根据各组尿液样本的总离子流图可知,在正、负离子模式下各组的代谢轮廓存在着明显差异,见图 1,2。PCA 和 OPLS-DA 结果显示,空白组和穿山龙提取物组在正、负离子模式下,两组均明显分开,表明穿山龙提取物使大鼠尿液中的内源性代谢物发生了变化,见图 3。模型组与空白组分列两边,表明 MSU 诱导后模型组大鼠尿液中的内源性代谢物发生了明显的变化,也说明代谢组学技术可以有效区分正常大鼠与疾病大鼠之间的差异,见图 4。穿山龙提取物干预组与模型组分开,但有向空白组靠近的趋势,说明与模型组的偏离情况相比,穿山龙提取物干预组已有所改善,见图 5。通过 S-plot 可以看出,绝大多数离子聚集于原点附近,只有少数离子偏离了原点,正是 S-plot 两端的离子造成了组间的差异,见图 6,7。筛选 VIP 值 > 1 且 *P* < 0.05 的离子作为潜在生物标志物,见图 8,9。



k. 空白组;g. 穿山龙提取物组;m. 模型组;gm. 穿山龙提取物干预组(图 2 ~ 5 和表 1 同)

图 1 不同组别大鼠尿液在正离子模式下的 UPLC-Q-TOF/MS 总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatograms of UPLC-Q-TOF/MS in urine of rats from different groups under positive ion mode

**2.6 潜在生物标志物的分析** 将给予穿山龙提取物的正常大鼠与模型大鼠的代谢变化进行比较,得到 12 个共同的生物标志物,见表 1。结果发现穿山龙提取物下调了正常组大鼠中肌氨酸、二甲基甘氨酸、脱氧胞苷等 12 个标志物的水平。穿山龙提取物上调了模型组大鼠中二甲基甘氨酸,肌氨酸,尿酸,富马酸,

*L*-胱硫醚,褪黑激素,4-吡哆酸,脱氧尿苷,5-甲氧基色胺,胞苷 10 个标志物的水平;下调了脱氧胞苷和 5-羟色胺 2 个标志物的水平。穿山龙提取物对肌氨酸,尿酸,*L*-胱硫醚,4-吡哆酸,脱氧尿苷,5-甲氧基色胺,胞苷,二甲基甘氨酸,褪黑激素,富马酸这 10 个标志物均表现出了纠正异常表达的趋势,见表 2。

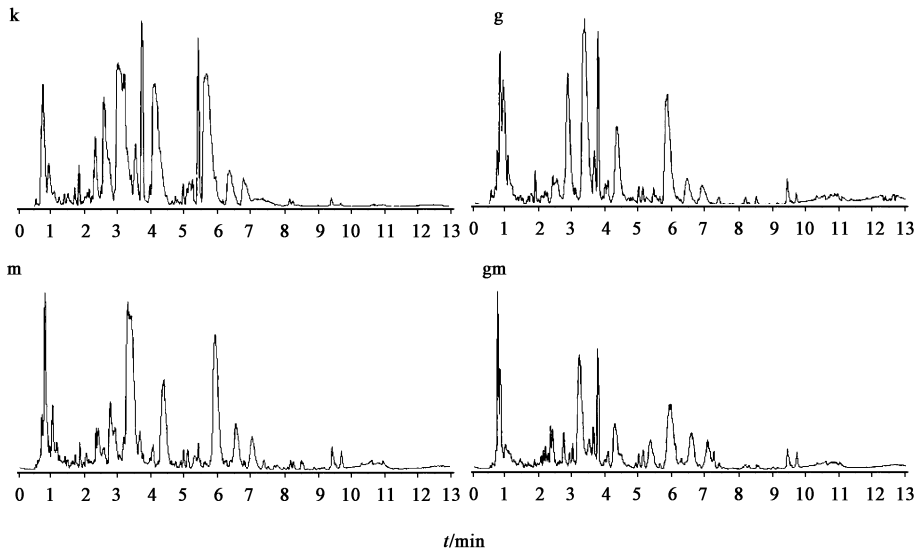
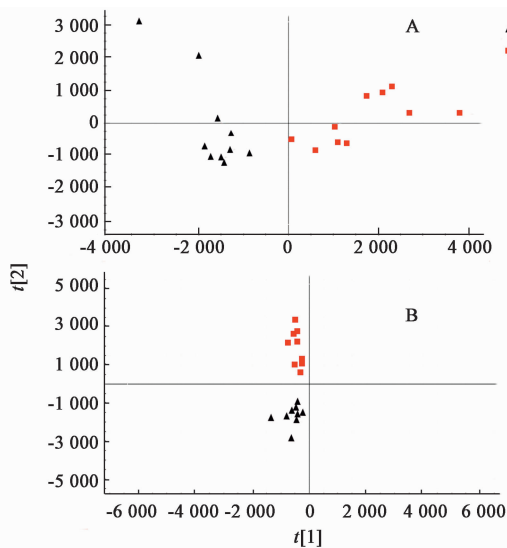


图 2 不同组别大鼠尿液在负离子模式下的 UPLC-Q-TOF/MS 总离子流

Fig. 2 Total ion current chromatograms of UPLC-Q-TOF/MS in urine of rats from different groups under negative ion mode



A. 正离子模式; B. 负离子模式(图 4~9 同)

图 3 不同离子模式下穿山龙提取物组和空白组大鼠的 OPLS-DA

Fig. 3 OPLS-DA of rat urine in DNRe group and blank group under different ion modes

**2.7 潜在生物标志物的分类** 对 12 个标志物进行分类,见图 10。在化学结构中包括机氧化合物、有机氮化合物、嘧啶化合物等;在生物功能中主要参与了甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,甲硫氨酸代谢、嘧啶代谢等;在细胞中这些代谢物则主要存在于细胞外、线粒体和细胞质等部位。

**2.8 潜在生物标志物的通路分析** 将 12 个潜在生物标志物进行 MetPA 的识别和通路富集分析,见图 11 和表 3。结果发现其主要富集于半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、色氨酸代谢。在给予穿山龙提取物干预

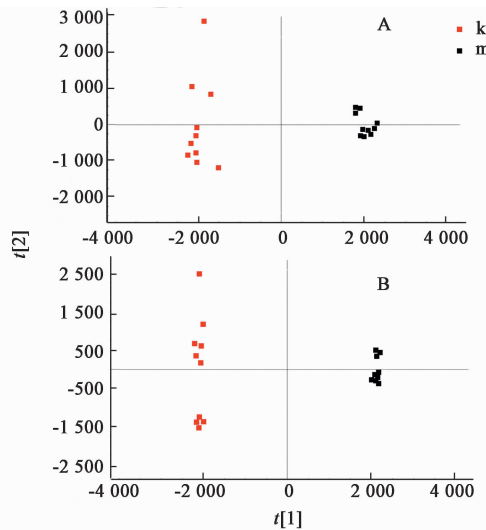


图 4 不同离子模式下空白组与模型组大鼠尿液的 OPLS-DA

Fig. 4 OPLS-DA of rat urine in model group and blank group under different ion modes

后,代谢物的含量得到回调,说明机体代谢通路的紊乱得到了一定程度的改善。

### 3 讨论

中医药在治疗疑难杂症及慢性病方面,与西药相比优势明显,但由于中药化学成分复杂,运用传统手段很难研究清楚中药的起效成分和药理机制,而机体在生理、病理状态下的变化可以通过血浆、尿液、粪便等体液或组织的代谢物反映出来,且尿液样本获取的方法简单,不会损害生物体,可连续多次取样进行动态分析,小分子代谢产物种类繁多、信息量大,故本文运用代谢组学并结合传统理论对穿山龙

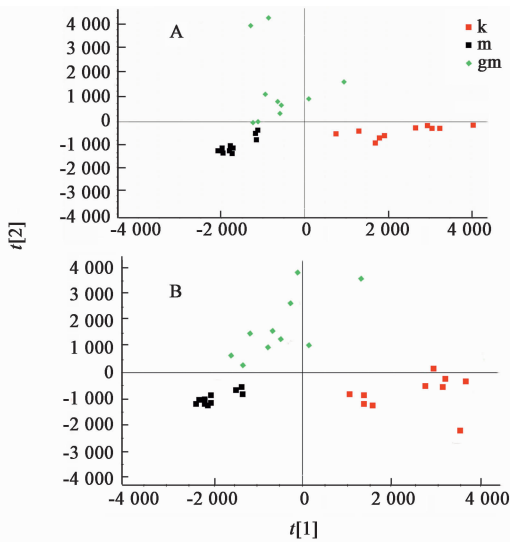


图 5 不同离子模式下穿山龙提取物干预组、空白组及模型组大鼠尿液的 OPLS-DA

Fig. 5 OPLS-DA of rat urine in model group, DNRe treatment group and blank group under different ion modes

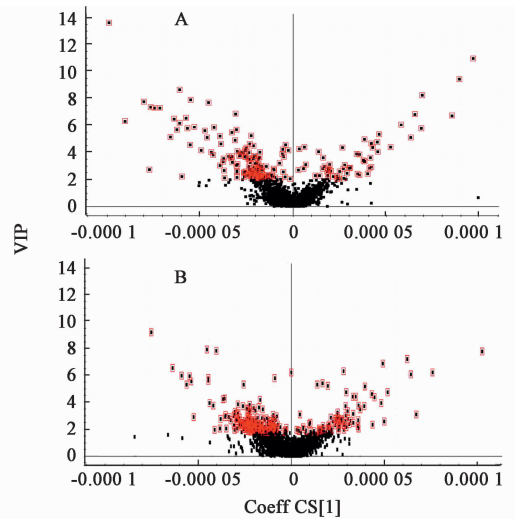


图 8 不同离子模式下穿山龙提取物组大鼠尿液的 VIP-plot

Fig. 8 VIP-plot of rat urine in DNRe group under different ion modes

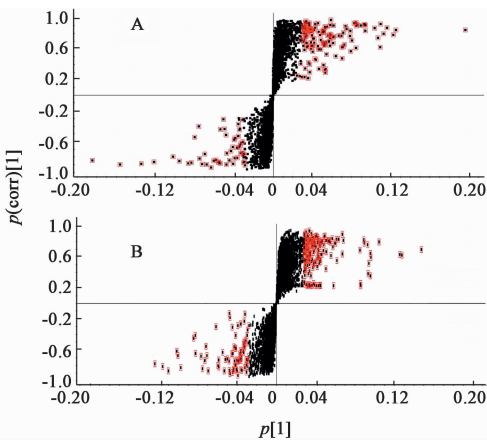


图 6 不同离子模式下穿山龙提取物组大鼠尿液的 S-plot

Fig. 6 S-plot of rat urine in DNRe group under different ion modes

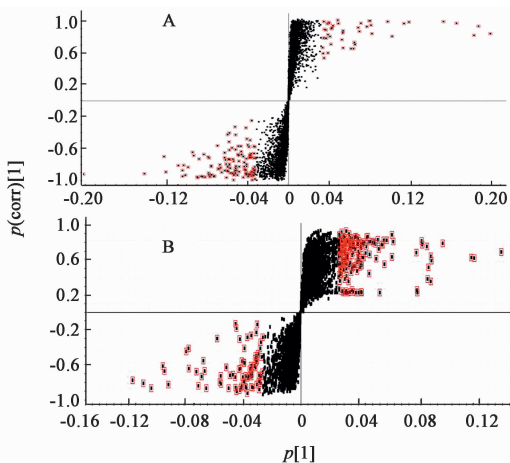


图 7 不同离子模式下穿山龙提取物干预组大鼠尿液的 S-plot

Fig. 7 S-plot of rat urine in DNRe treatment group under different ion modes

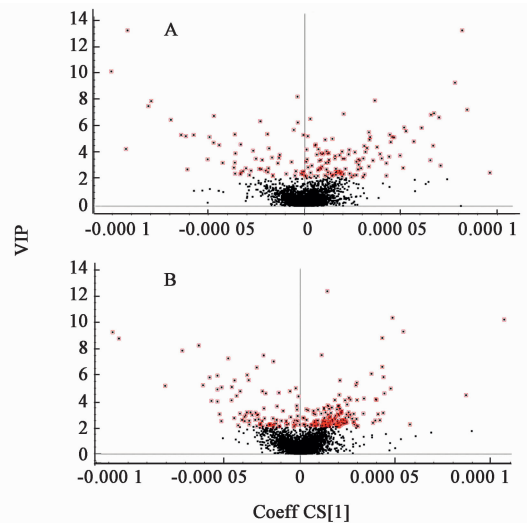


图 9 不同离子模式下穿山龙提取物干预组大鼠的 VIP-plot

Fig. 9 VIP-plot of rat urine in DNRe treatment group under different ion modes

治疗痛风性关节炎的作用机制进行探究。

*L*-胱硫醚参与了半胱氨酸和甲硫氨酸代谢,同型半胱氨酸与丝氨酸在胱硫醚合酶(cystathione beta synthase, CBS)的作用下合成胱硫醚,胱硫醚可进一步分解为半胱氨酸和  $\alpha$ -酮丁酸<sup>[10-11]</sup>。而半胱氨酸具有解毒的功效,可保护肝脏,改善炎症<sup>[12]</sup>。本文研究表明与空白组相比,模型组中 *L*-胱硫醚含量明显减少( $P < 0.01$ ),推测可能是因为 MSU 抑制了 CBS 的活性及胱硫醚的合成。而模型大鼠给予穿山龙提取物后 *L*-胱硫醚的含量显著回调( $P < 0.01$ ),推测其是通过调节胱硫醚向半胱氨酸的转化水平对急性痛风性关节炎起到防治作用。

表 1 潜在生物标志物在各组大鼠尿液中的离子强度 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Ionic strength of 12 potential biomarkers in urine of rats from each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

生物标志物	k	m	g	gm
肌氨酸	64 782.62 ± 27 126.21	15 096.97 ± 3 533.21 <sup>2)</sup>	40 385.45 ± 18 624.37 <sup>1)</sup>	40 129.59 ± 30 097.25 <sup>3)</sup>
二甲基甘氨酸	36 505.37 ± 28 608.93	6 705.57 ± 2 876.68 <sup>2)</sup>	7 923.15 ± 2 459.01 <sup>2)</sup>	8 341.26 ± 3 245.23
脱氧胞苷	67 720.65 ± 65 884.03	10 614.58 ± 5 468.76 <sup>1)</sup>	8 297.27 ± 7 721.16 <sup>1)</sup>	9 898.07 ± 4 501.10
尿酸	29 009.82 ± 19 356.73	6 094.79 ± 4 869.72 <sup>2)</sup>	8 726.49 ± 5 324.25 <sup>2)</sup>	13 019.74 ± 6 712.57 <sup>3)</sup>
5-羟色胺	22 232.58 ± 8 016.70	7 484.09 ± 1 320.19 <sup>2)</sup>	7 390.41 ± 1 795.23 <sup>2)</sup>	7 083.31 ± 3 402.62
L-胱硫醚	21 473.06 ± 13 648.21	7 000.70 ± 2 731.53 <sup>2)</sup>	7 373.81 ± 5 846.18 <sup>1)</sup>	13 906.97 ± 6 597.04 <sup>4)</sup>
4-吡哆酸	29 882.13 ± 13 592.94	6 244.06 ± 2 483.17 <sup>2)</sup>	13 200.13 ± 4 748.99 <sup>2)</sup>	14 150.49 ± 5 977.80 <sup>4)</sup>
脱氧尿苷	24 734.60 ± 14 196.29	1 942.59 ± 1 222.02 <sup>2)</sup>	4 800.14 ± 1 805.67 <sup>2)</sup>	4 068.86 ± 2 414.76 <sup>3)</sup>
褪黑激素	13 252.82 ± 4 625.98	2 963.42 ± 821.50 <sup>2)</sup>	3 369.38 ± 1 204.41 <sup>2)</sup>	6 337.95 ± 5 195.71
5-甲氧基色胺	12 966.42 ± 6 387.57	828.77 ± 239.18 <sup>2)</sup>	1 535.24 ± 521.84 <sup>2)</sup>	2 680.26 ± 2 199.38 <sup>3)</sup>
富马酸	11 468.35 ± 3 441.99	2 631.85 ± 1 432.74 <sup>2)</sup>	2 513.24 ± 987.24 <sup>2)</sup>	3 743.06 ± 2 842.83
胞苷	13 228.12 ± 8 939.53	1 109.84 ± 573.84 <sup>2)</sup>	2 329.96 ± 900.25 <sup>2)</sup>	3 152.96 ± 2 551.69 <sup>3)</sup>

注:与空白组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与模型组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 穿山龙提取物干预组及模型组大鼠尿液中潜在生物标志物的信息

Table 2 Information of potential biomarkers in urine of rats from DNRe treatment group and model group

No.	$t_R / \text{min}$	$m/z$	HMDB ID	ESI 模式	分子式	VIP 值	生物标志物
1	0.71	131.069 4	HMDB00064	正	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4.676	肌氨酸 creatine
2	0.73	103.075 0	HMDB00092	正	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	2.912	二甲基甘氨酸 dimethylglycine
3	0.86	227.091 4	HMDB00014	正	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4.241	脱氧胞苷 deoxycytidine
4	0.85	168.028 0	HMDB00289	负	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	3.001	尿酸 uric acid
5	2.72	176.104 5	HMDB00259	负	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	2.694	5-羟色胺 5-hydroxytryptamine
6	3.21	443.113 1	HMDB00099	负	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	2.313	L-胱硫醚 L-cystathionine
7	2.49	204.030 1	HMDB00017	负	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	3.371	4-吡哆酸 4-pyridoxic acid
8	1.34	228.074 5	HMDB00012	负	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	3.264	脱氧尿苷 deoxyuridine
9	7.43	253.107 8	HMDB01389	负	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.322	褪黑激素 melatonin
10	4.53	235.093 1	HMDB04095	负	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	2.464	5-甲氧基色胺 5-methoxytryptamine
11	1.65	277.002 2	HMDB00134	负	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2.176	富马酸 fumaric acid
12	1.66	264.054 3	HMDB00089	负	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	2.286	胞苷 cytidine

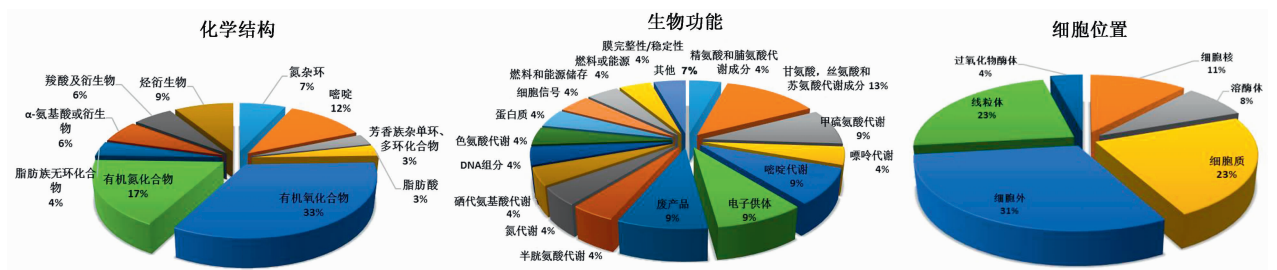


图 10 潜在生物标志物按化学结构、生物功能、细胞位置的分类情况

Fig. 10 Classification of potential biomarkers from aspects of chemical structure, biological function and cell location

色氨酸代谢途径是由 5-羟色胺和褪黑激素共同参与的,在色氨酸羟化酶和氨基酸脱羧酶的作用

下色氨酸可转化为 5-羟色胺(5-HT),5-HT 再由芳香基胺 N-乙酰基转移酶(AANTA)和羟基吲哚-O-

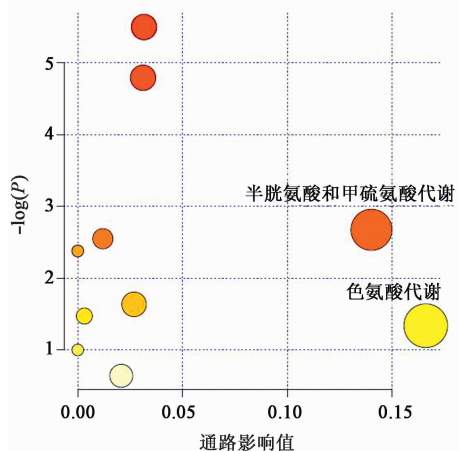


图 11 潜在生物标志物的代谢通路分析

Fig. 11 Analysis on metabolic pathways of potential biomarkers regulated by DNRe

表 3 潜在生物标志物经 MetPA 分析得到的代谢通路

Table 3 Metabolic pathways of potential biomarkers obtained by MetPA analysis

通路	化合物总数/个	通路期望值	匹配数/个	原始 P	校正后 P	FDR 校正值	通路影响值
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 glycine, serine and threonine metabolism	32	0.34	3	0.004 1	0.33	0.33	0.031 63
嘧啶代谢 pyrimidine metabolism	41	0.43	3	0.008 3	0.66	0.34	0.031 17
色氨酸代谢 tryptophan metabolism	41	0.43	2	0.068 9	1	1	0.140 21
精氨酸和脯氨酸代谢 arginine and proline metabolism	44	0.47	2	0.078 1	1	1	0.011 98
维生素 B <sub>6</sub> 代谢 vitamin B <sub>6</sub> metabolism	9	0.09	1	0.092 5	1	1	0
氮代谢 nitrogen metabolism	9	0.09	1	0.092 5	1	1	0
三羧酸循环(TCA 循环) tricarboxylic acid cycle	20	0.21	1	0.194 8	1	1	0.026 88
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	0.25	1	0.229 2	1	1	0.003 16
半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 cysteine and methionine metabolism	28	0.29	1	0.262 2	1	1	0.166 14
酪氨酸代谢 tyrosine metabolism	42	0.44	1	0.367 8	1	1	0
嘌呤代谢 purine metabolism	68	0.72	1	0.527 5	1	1	0.020 77

注: FDR. 错误发现率。

色胺, 富马酸和胞苷。通过进一步分析找出了与疾病相关性最强的通路为半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、色氨酸代谢。推测穿山龙提取物可能是通过显著上调了 L-胱硫醚, 促进半胱氨酸和甲硫氨酸代谢, 使 L-胱硫醚分解, 起到抗炎作用。褪黑激素的上调促进了色氨酸通路代谢, 进而减缓炎症、提高免疫力, 使机体恢复平衡状态, 达到防治急性痛风性关节炎的目的。通过相关靶点寻找防治急性痛风性关节炎的作用机制, 可为现代医学治疗该疾病提供有利的信息, 减轻患者痛苦。但正常大鼠给药后, 所有代谢物均呈现与空白组相反的趋势, 这可能是正常大鼠给予药物后体内的内源性小分子代谢物的比例发生

甲基转移酶 (HIOMT) 催化的 2 个步骤转化为褪黑激素。褪黑激素对软骨有保护作用<sup>[13]</sup>, 还具有抗炎<sup>[14]</sup>、调节免疫<sup>[15]</sup>的作用。本文研究表明与空白组相比, 模型组中 5-HT 和褪黑激素的含量明显减少 ( $P < 0.01$ ), 推测这是由于抑制了色氨酸羟化酶和氨基酸脱羧酶的活性, 抑制了整条色氨酸代谢途径, 使每一步代谢物的含量都有所减少。与模型组比较, 穿山龙提取物干预组有回调褪黑激素的趋势, 说明穿山龙提取物通过促进大鼠色氨酸代谢, 使褪黑激素含量升高, 进而通过抗炎、调节免疫和保护软骨来防治急性痛风性关节炎的发生。

本文共发现了 12 个共同的潜在生物标志物, 分别为肌氨酸, 二甲基甘氨酸, 脱氧胞苷, 尿酸, 5-HT, L-胱硫醚, 4-吡哆酸, 脱氧尿苷, 褪黑激素, 5-甲氧基

了变化, 机体的阴阳失衡所致。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 267.

[2] 王焯, 贾丽荣, 付聪敏, 等. 穿山龙薯蓣皂苷元对小鼠 T 淋巴细胞 CD69、CD25 表达影响的体外研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(7): 589-593, 599.

[3] 曹拥军, 蒋晟星, 罗燕萍, 等. 穿山龙对桥本甲状腺炎患者 Th1/Th2 型细胞因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 1103-1105.

[4] OU-YANG S H, JIANG T, ZHU L, et al. *Dioscorea nipponica* Makino: a systematic review on its

- ethnobotany, phytochemical and pharmacological profiles [J]. Chem Cent J, 2018, 12(1):57.
- [ 5 ] CAI J, LIU M J, WANG Z, et al. Apoptosis induced by Dioscinin HeLa cells [ J ]. Biol Pharm Bull, 2002, 25 ( 2 ):193-196.
- [ 6 ] 周琦,张翀,于栋华,等.穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1444-1448.
- [ 7 ] 刘颖,刘树民,于栋华,等.大孔树脂纯化穿山龙总皂苷的工艺优化[J].医药导报,2011,30(5):635-637.
- [ 8 ] 王铁杰.穿龙薯蓣质量控制方法和相关成分药动学研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2007.
- [ 9 ] 刘树民,张宁,周琦,等.药理效应法测定穿山龙总皂苷的药动学参数[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(16):75-79.
- [10] YAMAGATA S, ISAJI M, YAMANE T, et al. Substrate inhibition of *L*-cysteine  $\alpha$ ,  $\beta$ -elimination reaction catalyzed by *L*-cystathionine  $\gamma$ -lyase of *Saccharomyces cerevisiae* [ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 66 ( 12 ):2706-709.
- [11] AMINO Y, SUZUKI Y. Synthesis and evaluation of *L*-cystathionine as a standard for amino acid analysis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(1):95-101.
- [ 12 ] HE J, CHEN J, XIE P, et al. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp [J]. Aquat Toxicol, 2012, 116/117: 61-68.
- [ 13 ] YANG W, KANG X M, QIN N, et al. Melatonin protects chondrocytes from impairment induced by glucocorticoids via  $NAD^+$ -dependent SIRT1 [ J ]. Steroids, 2017, 126: 24-29.
- [ 14 ] GU J Y, LU Z S, JI C H, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells [ J ]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 969-975.
- [ 15 ] LUENGTRAKOON K, WANNAKASEMSUK W, VICHITRANANDA V, et al. Increased melatonin in oral mucosal tissue of oral lichen planus ( OLP ) patients: a possible link between melatonin and its role in oral mucosal inflammation [ J ]. Arch Oral Biol, 2017, 78: 13-19.

[责任编辑 刘德文]