

# 基于 LC-MS 的代谢组学技术分析 孜亚比提片的降糖作用机制

张彩娟<sup>1</sup>, 晋小雁<sup>1</sup>, 邱敏懿<sup>1</sup>, 张驰<sup>1</sup>, 罗凌龙<sup>1</sup>, 王敏<sup>2</sup>, 赵保胜<sup>2</sup>, 王学勇<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;

2. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**观察孜亚比提片对 2 型糖尿病大鼠的降糖效果,并基于代谢组学技术分析其降糖作用机制。**方法:**根据临床调研结果对不同组分来源的孜亚比提片进行筛选,筛选出最佳组方配比;并以 2 型糖尿病大鼠为实验对象进行药效学实验研究,正常组和模型组分别给予相同剂量的生理盐水、孜亚比提片组给予 300 mg·kg<sup>-1</sup>孜亚比提片、二甲双胍组给予 300 mg·kg<sup>-1</sup>盐酸二甲双胍片,每组 8 只,记录给药后实验组的空腹血糖值及体质量变化并进行数据分析;同时利用超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱联用(UHPLC-LTQ Orbitrap MS)技术对大鼠血清进行代谢组学分析,采用主成分分析(PCA),偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对不同组别大鼠血清代谢物进行分析,鉴定出潜在生物标记物,并分析维吾尔族药孜亚比提片的降糖作用机制。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠的空腹血糖值升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,孜亚比提片组大鼠状态整体较好,毛色光滑,其空腹血糖值也有所下降( $P < 0.05$ ),表明孜亚比提片对 2 型糖尿病大鼠有一定的降糖作用;根据 LC-MS 代谢组学数据结果最终得到 8 个生物标记物。与模型组相比孜亚比提片组中 L-valine, propionylcarnitine 含量均降低( $P < 0.05$ ), sphingosine-1-phosphate, LPC(16:1/0:0), LPC(18:0/0:0), LPC(18:2/0:0), LPC(20:1/0:0), PC(19:0/0:0)的含量均升高( $P < 0.05$ )。**结论:**孜亚比提片能够降低 2 型糖尿病大鼠血糖值,并能改善 2 型糖尿病大鼠的一般生理特征,其作用机制可能与改善氨基酸代谢,脂质代谢有关。

**[关键词]** 孜亚比提片; 2 型糖尿病(T2DM); 糖尿病; 液相色谱-质谱(LC-MS)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0141-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190604

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181204.1054.013.html>

**[网络出版时间]** 2018-12-05 14:33

## Hypoglycemic Mechanism of Ziya Biti Tablet Based on LC-MS Metabolomics Technique

ZHANG Cai-juan<sup>1</sup>, JIN Xiao-yan<sup>1</sup>, QIU Min-yi<sup>1</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>, LUO Ling-long<sup>1</sup>,

WANG Min<sup>2</sup>, ZHAO Bao-sheng<sup>2</sup>, WANG Xue-yong<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the hypoglycemic effect of Uygur medicine Ziya Biti tablet on the type 2 diabetic rats, and analyze the hypoglycemic mechanism based on metabolomic techniques. **Method:** According to the results of clinical research about different origins of Ziya Biti tablet, the optimal composition was screened out; type 2 diabetic rats were taken as an experimental object in the pharmacodynamic experiments; the control group

**[收稿日期]** 20180902(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81773841);中央本级重大增减支项目(2060302)

**[第一作者]** 张彩娟,在读硕士,从事民族药药效及代谢组学研究,E-mail:18513031449@126.com

**[通信作者]** \*王学勇,博士,教授,博士生导师,从事药用植物与分子生药学,民族药新药研发工作,Tel:010-64287660,E-mail:wxyph.d@163.com

and model group were given the same dose of normal saline, Ziya Biti tablet group was given  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the metformin group was given  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  metformin hydrochloride. The fasting blood and weight changes of the experimental group after the treatment were recorded and compared with normal group; ultra-high performance liquid chromatography-linear ion trap/electrostatic field orbit trap combined-type high resolution mass spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap MS) technology was used to conduct the metabolomics analysis on the rat serum, and principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) on different groups of rat serum metabolites were performed to identify potential biomarkers. **Result:** Compared with the model group, the rats in the Uygur medicine Ziya Biti tablet showed a healthy states, and the blood glucose were decreased ( $P < 0.05$ ), which indicated that Uygur medicine Ziya Biti tablet had a certain hypoglycemic effect on type 2 diabetic rats. Eight biomarkers were finally obtained according to the results. Compared with model group, L-valine and propionylcarnitine in the Uygur medicine group were decreased ( $P < 0.05$ ), while sphingosine-1-phosphate, LPC (16:1/0:0), LPC (18:0/0:0), LPC (18:2/0:0), LPC 20:1/0:0), PC (19:0/0:0) were elevated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The experimental results showed that Uygur medicine Ziya Biti tablet can reduce the blood glucose of type 2 diabetic rats and allivate general physiological characteristics. The mechanism of action may be related to the improvement of amino acid metabolism and lipid metabolism.

[ **Key words** ] Ziya Biti tablet; type 2 diabetic (T2DM); diabetes; LC-MS

2 型糖尿病是由于胰岛素分泌相对不足引起机体内糖脂代谢、蛋白质、水、电解质代谢紊乱,从而导致血糖升高,形成一种复杂的代谢紊乱性疾病,特点是高血糖,伴有高血压、肥胖、动脉粥样硬化等特点,其发病原因与遗传和环境因素密切相关。目前超过 90% 的糖尿病患者是 2 型糖尿病,并且发病率在逐年增加<sup>[1-4]</sup>。糖尿病患者在临床上会表现出多饮、多食、多尿、消瘦的症状,并且随着病程的延长会引起心脑血管疾病、白内障、视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病足、周围神经病变等一系列的并发症,严重影响人体健康。

孜亚比提片是一种根据民间治疗糖尿病的独特疗效研制出的纯中药制剂,主要组成有马齿苋子、阿拉伯树脂胶、莴苣子、甘草膏、天竺黄、玫瑰花、芫荽子、檀香、紫檀香等 13 种中药,具有一定的降低血糖,改善胰岛素抵抗的作用<sup>[5]</sup>,孜亚比提片根据药物配比不同,有不同的孜亚比提片组方,如库日斯孜亚比提片 I,降糖孜亚比提片,库日斯孜亚比提片 III,复方孜亚比提片,库尔斯孜亚比土司片,降糖孜亚比提片 I 等,在维吾尔族医学上主要用于治疗消渴症引起的疲乏,烦渴等糖尿病症状,并被卫生部药品标准所收录<sup>[6]</sup>。本实验通过孜亚比提片对糖尿病大鼠的治疗,研究维吾尔族药孜亚比提片降糖作用机制。

代谢组学是近年来发展非常迅速的学科,对于代谢组学的定义目前普遍接受英国帝国理工的 Jeremy Nicholson 教授对于 Metabonomics 的定义为

对生物体由于病理生理刺激或基因改变所引起的代谢物质变化进行定量测定<sup>[7]</sup>。其主要是通过核磁共振、液质联用、气质联用等高通量、高灵敏度与高精度的现代分析技术<sup>[8-13]</sup>,对各类生物样本(包括细胞提取物、组织提取物和生物体液中)的代谢物进行检测,通过现代分析技术对其代谢产物进行产物精确的定性定量分析,同时结合有效的模式识别方法(有监督的识别模式,如主成分分析;无监督的识别模式,如偏最小二乘判别分析)进行样本间差异性分析,从中筛选出显著性差异代谢物,然后将差异代谢物信息与病理过程中的生化反应、调控因素等生物知识关联起来,从而实现从系统的角度去了解机体生命活动的整体代谢过程<sup>[14-17]</sup>。目前代谢组学技术被广泛应用于药物研发、药物作用机制等领域的研究,通过代谢组学技术研究糖尿病的治疗机制并分析其潜在小分子差异代谢物是现在研究的热门技术。王静等<sup>[18]</sup>利用液相色谱-质谱(GC-MS)代谢组学技术研究黄连、生地黄治疗 2 型糖尿病的配伍机制,结果发现 12 个差异代谢与 2 型糖尿病有关;皮子凤等<sup>[19]</sup>利用血清代谢组学技术研究五味子治疗糖尿病肾病大鼠的作用机制,结果发现五味子可以通过影响嘌呤代谢、肠内菌代谢治疗糖尿病肾病。

本实验运用代谢组学技术对孜亚比提片改善糖尿病大鼠的治疗作用进行研究,分析出其潜在的生物标记物,并对其作用机制进行分析,为后期孜亚比提片的开发利用提供参考。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只, 体重(200 ± 20) g。由北京维通利华实验动物有限公司提供, 动物生产合格证号 SCXK(京)2012-0001。所有动物均饲养于北京中医药大学屏障环境动物室, 所有动物自由饮水, 室温(23 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 每天光照 12 h, 本研究获得北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 BUCM-4-2018070117-3017)。

**1.2 药物及试剂** 盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司, 批号 AAH5795); 羧亚比提片进行药材提取: 羧亚比提片药材(马齿苋子、阿拉伯树脂胶、莴苣子、甘草膏、天竺黄、玫瑰花、芫荽子、檀香、紫檀香等组成, 药材由北京中医药大学王学勇教授鉴定均为正品), 所有药材 500 g 进行粉碎, 加 10 倍量的 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 然后旋转蒸发回收乙醇至干膏并冷冻干燥, 研碎至粉末, 低温保存备用。强生血糖仪、强生血糖试纸、无菌采血针[强生(中国)医疗器械有限公司, 批号分别为 E1705015E, 4425155, D2696]; 生理盐水(北京化工厂, 批号 20170301); 乙醇(国药集团药业股份有限公司, 批号 20170410); 甲酸、乙腈(美国费希尔公司, 批号分别为 91170150, 177892); 链脲佐菌素(STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 317H032); 柠檬酸、柠檬酸钠(国产分析纯试剂, 批号 20180411)。

**1.3 仪器** CHRIST 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司); e2695 型高效液相色谱 C<sub>18</sub> 苯基柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm)(美国 Waters 公司); LTQ-Orbitrap XL 型高效液相色谱串联二维线性离子阱-静电场轨道阱质谱仪, Multifuge X1R 型 simca 低温高速离心机(美国赛默飞公司); 超纯水 Milli-Q 系统(美国 Millipore Co 公司)。

## 2 方法

**2.1 临床病例调查分析羧亚比提片的降糖作用效果** 根据对维药羧亚比提片的组方收集, 并进行文献调研, 根据文献调研结果进行比对, 选择库日斯羧亚比提片 I, 降糖羧亚比提片, 库日斯羧亚比提片 III, 复方羧亚比提片, 库尔斯羧亚比土司片, 降糖羧亚比提片 6 个组方进行收集, 并进行临床数据分析。

**2.2 羧亚比提片对糖尿病大鼠的降糖作用研究** 结合临床实验数据, 为进一步分析羧亚比提片的降糖效果及降糖作用机制, 笔者选用糖尿病大鼠进行

动物实验, 通过检测每周动物的血糖值变化, 分析维药羧亚比提片对糖尿病大鼠的降糖作用, 并运用 LC-MS 代谢组学技术分析其降糖作用机制。

**2.2.1 糖尿病模型的建立** 雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常组、模型组、羧亚比提片组、二甲双胍组, 每组 8 只。正常组喂养标准饲料(热量组成为糖 65.5%, 脂肪 0.3%, 蛋白质 24.2%); 其余组喂养高脂饲料(热量组成为糖 20.1%, 脂肪 59.8%, 蛋白质 20.1%, 其中脂肪主要为猪油)。高脂食物喂养 8 周后, 除正常正常组外, 其余各组分别腹腔注射 STZ(35 mg·kg<sup>-1</sup>) 进行造模, 正常组腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液, 于注射 72 h, 1 周后分别检测血糖值。若 2 次血糖浓度均高于 11.1 mmol·L<sup>-1</sup> 则造模成功<sup>[20]</sup>。

造模成功后进行口服给药, 阳性药组口服二甲双胍 300 mg·kg<sup>-1</sup>, 羧亚比提片组口服羧亚比提片提取物 300 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[5]</sup>, 模型组和正常组分别给予 10 mL·kg<sup>-1</sup> 的生理盐水。每天早上 8:00 同一时间点进行灌胃给药, 并与每周末检测血糖值。

**2.2.2 样本收集及血清样本前处理** 实验结束后, 禁食不禁水 12 h, 所有实验大鼠腹腔注射戊巴比妥 50 mg·kg<sup>-1</sup> 溶液, 腹主动脉取血, 置于预冷的离心机中 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后, 移液枪吸取上层血清, 置于 -80 °C 冰箱备用。

**2.2.3 样本前处理** 取血清样品 200 μL, 加乙腈沉淀蛋白 600 μL, 涡旋震荡, 混合液转移到 1.5 mL 离心管中, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。吸取上清液转移到 1.5 mL 离心管中, 冻干仪吹干溶液。5% 的乙睛水溶液(5:95 V:V) 100 μL 复溶上清液干燥物。涡旋震荡充分混匀, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液转移到进样瓶, 该溶液用于 UHPLC-LTQ/Orbitrap 代谢组学分析。

为保证分析方法的稳定性, 将各组血清样品等量混合作为质量控制样本(QC)。将 QC 样本作为检测样品均匀插入到测样序列中, 即每分析 10 个血清样品就放入 1 个 QC 样品。样本测试时上述样本按顺序进行 LC-MS 谱序列检测, 实时监测谱图, 保证样品从前处理过程到样品检测过程中的稳定性。检测血清样本前, 连续进行 5 个 QC 样本的测定, 使系统达到平衡; 然后每检测 10 个血清样品, 进行 1 次 QC 样本的检测。

**2.2.4 液质实验条件** 色谱条件为流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B 为乙腈, 流动相 B 的比例为 0 ~ 10 min, 8% ~ 50%, 10 ~ 20 min, 50% ~

70% ; 20 ~ 23 min, 70% ~ 90% ; 23 ~ 25 min, 90% ; 25 ~ 27 min, 90% ~ 8% ; 27 ~ 31 min, 8% 。流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 2 μL。

质谱条件为扫描模式为负离子模式, 获得离子范围为  $m/z$  50 ~ 1 500; 毛细管电压为 -35 V; 毛细管温度为 350 ℃; 管透镜电压为 -110 V; 多级质谱碰撞归一化能量为 35 eV; 静电场轨道离子阱扫描分辨率为 R 3 万; 数据依赖性扫描模式。

**2.3 数据处理** 从 LC-MS 获得的原始数据是使用 Sieve software ( version 1.1.5, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) 进行原始数据转化, 并同时的去燥, 保留时间校正等数据预处理。然后用 Simca-p ( version 14.1, Umetrics AB, Umea, Sweden) 软件进行多元数据统计分析, 包括无监督的主成分分析 (PCA) 和有监督的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。PCA 模型首先用于广义分离, 运用 OPLS-DA 方法来判别基于 VIP 值的潜在生物标记, 然后通过 SPSS 14.0 进行统计分析, 根据  $P$  和 VIP 值对两组间差异代谢物进行分析, 基于  $P < 0.05$  和  $VIP > 1$  被认为是潜在的生物标记物。

### 3 结果

**3.1 临床病例调研分析** 临床实验数据结果表明, 临床调查病例共 153, 其中经过孜亚比提片治疗 109 例患者病情好转。且出现好转的患者体质均为干寒体质, 因此笔者认为孜亚比提片对干寒体质的患者有较好的作用。各组治疗后疗效整体情况如下: 按照临床评价标准, 复方孜亚比提片有效 109 例, 无效 33 例, 总有效率 69.72% ; 库尔斯孜亚比提片, 有效 113 例, 无效 37 例, 总有效率 67.26% ; 降糖孜亚比提片, 有效 54 例, 无效 16 例, 总有效率 70.37% ; 唐宁孜亚比提片, 有效 219 例, 无效 52 例, 总有效率 76.20% ; 库日斯孜亚比提片 I 有效 83 例, 无效 28 例, 总有效率 66.27% ; 正常组二甲双胍, 有效 140 例, 无效 13 例, 总有效率 90.71% 。说明维吾尔族药孜亚比提片组方具有一定的降糖效果。见表 1。

从各孜亚比提片组方中, 选取数据比较可靠的病例, 详细记录其治疗前后空腹血糖值, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 该数据结果说明各孜亚比提片均具有一定降血糖作用。但在孜亚比提片治疗过程中, 不排除部分病人某些时段使用其他降糖药, 这也会对部分组方的实际效果产生一定影响, 因此, 该临床数据只能作为参考, 具体各组方的药效与活性评价, 还需通过更严谨的动物实验来进行筛选评价, 见表 2。

表 1 各组孜亚比提片组方治疗 2 型糖尿病的临床疗效统计

Table 1 Clinical efficacy statistics of treatment of type 2 diabetes with zialbiti tablets in each group

组别	有效/例	无效/例	总有效率/%
复方孜亚比提片	109	33	69.72
库尔斯孜亚比提片	113	37	67.26
降糖孜亚比提片	54	16	70.37
糖宁孜亚比提片	219	52	76.20
库日斯孜亚比提片 I	83	28	66.27
二甲双胍	140	13	90.71

注: 总有效率 = 有效 / (有效 + 无效) × 100% ; 维吾尔族医辨证均为干寒。

表 2 各组治疗前后空腹血糖的比较

Table 2 Comparison of fasting blood glucose before and after treatment in each group

组别	病例数	疗程 / 个	空腹血糖值 ( $\bar{x} \pm s$ ) / mmol·L <sup>-1</sup>	
			治疗前	治疗后
复方孜亚比都司片	103	33	10.19 ± 4.39	8.66 ± 3.21
降糖孜亚比提片	85	31	9.57 ± 4.03	8.18 ± 3.08
孜亚比提片 I	60	35	10.22 ± 4.20	8.76 ± 3.19
二甲双胍	34	31	9.48 ± 4.76	7.94 ± 2.10

注: 1 个疗程为 7 d。

### 3.2 孜亚比提片对糖尿病大鼠的降糖作用

**3.2.1 给药后大鼠血糖值变化** 实验过程中笔者对糖尿病大鼠的血糖值进行实时监测, 最终给药 11 周之后, 糖尿病鼠体质量持续下降; 并且每周对糖尿病大鼠血糖值进行检测, 治疗前后空腹血糖值的结果见表 3, 在糖尿病大鼠给药前, 模型组、孜亚比提片组血糖均显著性上升 (两者无显著性差异) 均为 II 型糖尿病模型大鼠。经过孜亚比提片组治疗后其血糖值较模型组出现显著性差异, 持续到 9, 10, 11 周一直出现稳定显著性差异。

**3.2.2 LC-MS/MS 代谢组学多元统计分析** 对糖尿病实验大鼠的血清进行样本处理并进行 LC-MS/MS 技术分析, 利用 SPSS, Simca 及 KEGG 网络代谢通路等相关软件对糖尿病大鼠血清数据进行处理分析, 获得糖尿病大鼠血清的差异代谢物进一步解释其代谢机制, 主成分分析实验数据表明正常组和模型组有很好的分离度表示糖尿病模型是成功的 ( $R^2X = 0.652, Q^2 = 0.408$ ), 而且各组之间能很好的聚类, 说明组间差异较小, 更有利于实验数据分析; 同时孜亚比提片组有向正常组靠近的趋势, 说明孜亚比提片组的差异代谢物变化与正常组有一定相似性; 表明孜亚比提片组对改善糖尿病代谢物有一定

表 3 正常组、模型组以及给药组大鼠空腹血糖浓度动态变化

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
正常	-	5.33 ± 0.58	4.48 ± 0.52	5.02 ± 0.35	5.18 ± 0.54	5.06 ± 0.34	4.90 ± 0.67
模型	-	20.25 ± 2.12 <sup>1)</sup>	20.42 ± 4.47 <sup>1)</sup>	20.26 ± 2.06 <sup>1)</sup>	25.53 ± 3.59 <sup>1)</sup>	22.31 ± 2.01 <sup>1)</sup>	22.02 ± 2.47 <sup>1)</sup>
孜亚比提片	300	20.36 ± 1.88	18.01 ± 2.49	22.76 ± 4.49	22.35 ± 2.72	17.97 ± 5.01 <sup>2)</sup>	18.79 ± 2.87 <sup>2)</sup>
二甲双胍	300	19.79 ± 3.95	16.45 ± 3.41	20.81 ± 5.86	18.50 ± 4.64	15.75 ± 5.85 <sup>2)</sup>	16.14 ± 4.07 <sup>2)</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周
正常	-	5.15 ± 0.74	4.84 ± 0.44	4.56 ± 0.42	4.56 ± 0.42	4.81 ± 0.59
模型	-	21.50 ± 1.45 <sup>1)</sup>	25.31 ± 3.34 <sup>1)</sup>	22.95 ± 1.79 <sup>1)</sup>	24.45 ± 1.97 <sup>1)</sup>	22.00 ± 0.93 <sup>1)</sup>
孜亚比提片	300	20.89 ± 1.47	20.63 ± 5.47	20.11 ± 3.07 <sup>2)</sup>	19.53 ± 3.65 <sup>2)</sup>	19.08 ± 3.17 <sup>2)</sup>
二甲双胍	300	14.10 ± 5.23 <sup>2)</sup>	13.59 ± 5.51 <sup>2)</sup>	14.93 ± 6.59 <sup>2)</sup>	11.69 ± 4.67 <sup>2)</sup>	13.88 ± 4.35 <sup>2)</sup>

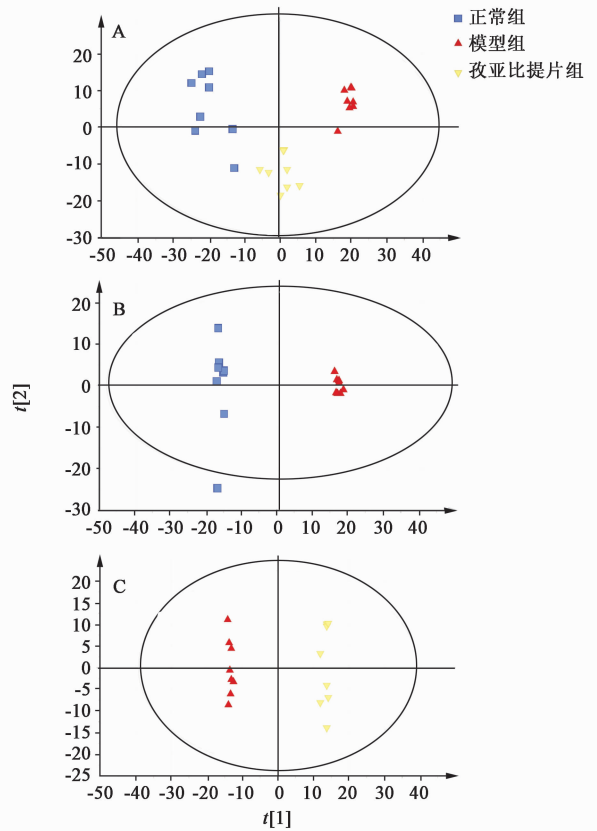
注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,<sup>3)</sup>P < 0.01。

的作用,有一定的调节血糖紊乱的功能。根据 OPLS-DA 对正常组和模型组样本进行深入分析,实验结果发现正常组和模型组能更好的分离,表明糖尿病模型的成功。同样在 OPLS-DA 中模型组和孜亚比提片组有很好的分离度,说明孜亚比提片对糖尿病的有一定的治疗作用。见图 1。

**3.2.3 潜在生物标记物的筛选** 最后为确定与糖尿病大鼠相关的差异代谢物,采用 OPLS-DA 对正常比模型样本进行深入分析获得 VIP 值,同时运用 SPSS 14.0 软件对正常组与模型组的血清代谢物进行 One-Way ANOVA 数据分析,获得 P,根据 VIP > 1, P < 0.05 确定该代谢物为与糖尿病大鼠潜在的差异代谢物。通过 KEGG 网站进行谱图检索定性,根据差异代谢物的谱图信息与数据库谱图信息差异小于 5 ppm 的化合物作为差异代谢物,共发现并鉴定了 8 个差异代谢物,这些差异代谢物相对含量变化结果见表 4。与模型组相比正常组与孜亚比提片组中 L-valine, propionylcarnitine 含量均降低,正常组和孜亚比提片组中 sphingosine-1-phosphate,溶血磷脂酰胆碱(LPC)(16:1/0:0),LPC(18:0/0:0),LPC(18:2/0:0),LPC(20:1/0:0),磷脂酰胆碱(PC)(19:0/0:0)的含量均升高。表明孜亚比提片能够影响改善氨基酸代谢,脂质代谢从而对糖尿病大鼠进行治疗。

**4 讨论**

血清中含有丰富的小分子代谢物,其相应的含量变化可以全面地反应药物对疾病的作用<sup>[21-25]</sup>。本研究通过 LC-MS 代谢组学技术结合多元变量统计分析对不同组别糖尿病大鼠血清样本进行检测分析。实验结果表明孜亚比提片使 2 型糖尿病鼠的体



A. 三组的 PCA 得分;B. 正常组对比模型组 OPLS-DA 得分;C. 孜亚比提片组对比模型组 OPLS-DA 得分

图 1 基于 LC-MS 代谢组学的多元数据分析

**Fig.1 Multivariate data analysis based on LC-MS metabolomics** 内代谢物发生显著改变。对数据进行 OPLS-DA 分析,找出与模型组相比较的差异代谢物,并对差异代谢物进行鉴定,最终鉴定出 8 个潜在生物标记物,包括缬氨酸,Propionylcarnitine,鞘脂类,溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)(16:1),LysoPC(18:0),LysoPC

表 4 相关潜在标志物和代谢通路

Table 4 Related potential markers and metabolic pathways

No.	$t_R$ /min	潜在标志物	相关代谢通路	含量变化趋势	
				正常组对比模型组	孜亚比提片组对比模型组
1	1. 79	L-valine	valine, leucine and isoleucine biosynthesis	↓ <sup>2)</sup>	↓ <sup>2)</sup>
2	9. 86	propionylcarnitine	unkown	↓ <sup>1)</sup>	↓
3	13. 60	sphingosine-1-phosphate	sphingolipid metabolism	↑ <sup>1)</sup>	↑
4	14. 63	LPC(16:1/0:0)	glycerophospholipid metabolism	↑ <sup>2)</sup>	↑
5	18. 68	LPC(18:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism	↑ <sup>1)</sup>	↑
6	15. 65	LPC(18:2/0:0)	glycerophospholipid metabolism	↑ <sup>1)</sup>	↑
7	21. 61	LPC(20:1/0:0)	glycerophospholipid metabolism	↑ <sup>2)</sup>	↑ <sup>2)</sup>
8	22. 33	PC(19:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism	↑ <sup>2)</sup>	↑ <sup>2)</sup>

注: ↑, ↓表示正常组和孜亚比提片组与模型组相比变化趋势。<sup>1)</sup>  $P < 0. 05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0. 01$ 。

(18:2), LysoPC(20:1), LysoPC(19:0)。本实验又根据代谢组学实验数据做出相应的差异代谢物的相对含量变化(表4),从表中可以看出缬氨酸参与的氨基酸循环中正常组和给药组与模型组相比均有显著性差异,溶血磷脂酰胆碱主要参与脂代谢过程,给药组与模型组相比也有显著性差异,说明孜亚比提片能够改善大鼠体内脂代谢水平。

PC又名卵磷脂,是细胞膜的重要组成成分,并且可能参与到细胞信号转导过程。此外,磷脂酰胆碱是脂蛋白的主要成分,同时也是人血清中含量最为丰富的脂类代谢物,主要是在肝脏合成的,过饮食摄入的胆碱是其必要的原料之一能保护血清中的脂蛋白被氧化。在胆碱缺少的大鼠中,由于磷脂酰胆碱合成减少,高脂饮食可导致脂肪在肝脏的堆积,本研究中孜亚提片可以提高糖尿病发病过程中PC(19:0/0:0)的水平。

肥胖个体血浆游离氨基酸中丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸等氨基酸水平升高。亮氨酸和异亮氨酸为支链氨基酸,糖尿病时由于支链酮酸脱氢酶活力下降,导致支链氨基酸在肝外降解减少而血中的支链氨基酸浓度升高,本研究发现孜亚比提片可以明显降低缬氨酸水平调节血糖。

LysoPC属于溶血磷脂(lysophosphatides, LysoPLs),是一类脂类小分子代谢物,是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的主要活性成分,在体内ox-LDL可通过磷脂酶A2(phospholipidase A2, PLA2)水解,LDL去掉磷脂酰胆碱二位碳原子上的脂肪酸而生成LPC<sup>[26-29]</sup>。有研究表明LPCs可以改善脂肪膜上的GLUT4的表达,

促进脂肪组织对葡萄糖的利用,从而改善葡萄糖稳态来改善糖尿病鼠的生理状态降低血糖值<sup>[30-31]</sup>。同时在OGTT受损和T2DM患者体内的研究中,发现其LPCs水平较健康人群显著降低,本研究发现糖尿病大鼠血清中LPCs发生严重紊乱,其中LysoPC(16:1/0:0), LysoPC(18:0/0:0), LysoPC(18:2/0:0), LPC(20:1/0:0), PC(19:0/0:0)显著降低,其变化原因可能是糖尿病模型鼠肝脏脂肪蓄积导致肝脏功能受损进而导致LPCs代谢平衡失调<sup>[32]</sup>。经过孜亚比提片11周治疗后,与模型组相比,孜亚比提片组大鼠体内LPCs显著升高,变化趋势接近正常组,说明孜亚比提片可以通过改善LPCs代谢紊乱来治疗糖尿病。

实验基于临床数据研究的基础上筛选出比较合适的孜亚比提片组方,并根据组方信息进行相关的药效学实验,进一步根据实验动物进行验证实验结果的可靠性,同时根据代谢组学的实验数据分析维药孜亚比提片相关的降血糖作用机制。实验结果表明孜亚比提片有一定的降血糖作用,同时能很好地改善糖尿病大鼠的生理机能,其作用机制可能与改善氨基酸代谢及脂代谢有关,本实验结果可以为后期孜亚比提片的研究提供参考。

[参考文献]

[1] Stumvoll M B, Goldstein J, van Haeften T W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [J]. Lancet, 1900, 365(9467): 1333-1346.  
[2] Dedoussis G V, Kaliora A C, Panagiotakos D B. Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review [J]. Rev Diabet Stud, 2007, 4(1): 13-24.

- [ 3 ] Yach D, Stuckler D, and Brownell K D. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes [ J ]. *Nat Med*, 2006, 12 ( 1 ) : 62-66.
- [ 4 ] 朱禧星. 现代糖尿病学 [ M ]. 上海:上海医科大学出版社, 2000:125.
- [ 5 ] 李桂荣, 李桂红, 王焯, 等. 羧亚比提片对血糖和血脂作用的实验研究 [ J ]. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27 ( 7 ) : 495-499.
- [ 6 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册 [ M ]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999:162.
- [ 7 ] 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 ) : 1181-1189.
- [ 8 ] Kim H K, Choi Y H, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants [ J ]. *Nat Protoc*, 2010, 5 ( 3 ) : 536-549.
- [ 9 ] Lanza I R, ZHANG S, Ward L E, et al. Quantitative metabolomics by <sup>1</sup>H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes [ J ]. *PLoS One*, 2010, 5 ( 5 ) : 10538.
- [ 10 ] Wishart D S. Quantitative metabolomics using NMR [ J ]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27 ( 3 ) : 228-237.
- [ 11 ] Patterson J, Focant J F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass [ J ]. *J High Resolut Chromatogr*, 2003, 23 ( 3 ) : 208-214.
- [ 12 ] YI L Z, HE J, LIANG Y Z, et al. Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA [ J ]. *FEBS Lett*, 2006, 580 ( 30 ) : 6837-6845.
- [ 13 ] Fiehn O. Erratum: metabolite profiling for plant functional genomics [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 ( 11 ) : 1157-1161.
- [ 14 ] Lindon J C, John C, Holmes E, et al. Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project [ J ]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 187 ( 3 ) : 137-146.
- [ 15 ] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展 [ J ]. *色谱*, 2003, 21 ( 4 ) : 316-320.
- [ 16 ] Stringer K A, McKay R I, Karnovsky A, et al. Metabolomics and its application to acute lung diseases [ J ]. *Front Immunol*, 2016, 7 ( 4 ) : 44.
- [ 17 ] Matthiesen R. Bioinformatics methods in clinical research [ J ]. *Methods Mol Biol*, 2010, 646 ( 3 ) : 67-76.
- [ 18 ] 王静, 袁子民, 李云兴, 等. 基于 GC-MS 代谢组学法研究黄连、生地黄治疗 II 型糖尿病的配伍机制 [ J ]. *中国中药杂志*, 2014, 39 ( 3 ) : 526-530.
- [ 19 ] 皮子凤, 门丽慧, 张静, 等. 五味子治疗大鼠糖尿病肾病作用机制的血清代代谢组学研究 [ J ]. *分析化学*, 2015, 43 ( 2 ) : 169-175.
- [ 20 ] 陈瑞, 马宁宁, 范姗姗, 等. 基于代谢组学分析金芪降糖片改善 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的作用机制 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 ( 20 ) : 102-107.
- [ 21 ] Wishart D S. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation [ J ]. *Am J Transplant*, 2010, 5 ( 12 ) : 2814-2820.
- [ 22 ] James E L, Parkinson E K. Serum metabolomics in animal models and human disease [ J ]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015, 18 ( 5 ) : 478-483.
- [ 23 ] 陈瑞, 马宁宁, 范姗姗, 等. 基于代谢组学分析金芪降糖片改善 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的作用机制 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 ( 20 ) : 102-107.
- [ 24 ] 常晋霞, 刘文虎, 王仕宝, 等. 基于 GC-MS 代谢组学分析刺五加总苷提取物的降糖作用 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 ( 16 ) : 101-107.
- [ 25 ] 冯小可, 刘佳莅, 王岚, 等. 香砂六君丸对糖尿病胃轻瘫大鼠的血清代代谢组学研究 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 ( 23 ) : 87-91.
- [ 26 ] XING F. Lysophosphatidylcholine up-regulates human endothelial nitric oxide synthase gene transactivity by c-Jun N-terminal kinase signalling pathway [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2010, 13 ( 6 ) : 1136-1148.
- [ 27 ] Murugesan G, Sandhya Rani M R, Gerber C E, et al. Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines [ J ]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35 ( 11 ) : 1375-1384.
- [ 28 ] WANG L, LIU J, MO Y Y, et al. Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A [ J ]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16 ( 5 ) : 2234-2247.
- [ 29 ] Yea K, Kim J, Yoon J H, et al. Lysophosphatidylcholine activates adipocyte glucose uptake and lowers blood glucose levels in murine models of diabetes [ J ]. *J Biol Chem*, 2009, 284 ( 49 ) : 33833-33840.
- [ 30 ] Barber M N, Risis S, YANG C, et al. Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7 ( 7 ) : 41456.
- [ 31 ] 王中华. 基于代谢组学的 2 型糖尿病和环境污染暴露生物标志物研究 [ D ]. 北京:北京协和医学院, 2015.
- [ 32 ] 宋丹军, 潘家琪, 李鹏旭, 等. 溶血磷脂酰胆碱在肝脏疾病中的研究进展 [ J ]. *中国药理学通报*, 2014, 30 ( 12 ) : 1642-1646.

[责任编辑 周冰冰]