

CCL₄ 诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究^{*}

□王喜军^{**} 孙文军 孙 晖 吕海涛 邹迪新
吴泽明 王 萍 刘 莲 吴修红
(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要:基于代谢组学的系统化理论,以 UPLC/QTOF 分析系统为核心手段,结合生物样品分析制备方法,研究 CCL₄ 诱导肝损伤大鼠的代谢组变化,以及茵陈蒿汤干预后的肝损伤大鼠代谢组的回调趋势。同时,借助 MS 解析理论和主成分分析软件,明晰表征大鼠肝损伤的 5 个内源性特征生物标记物,并结合系统生物学的理论还原肝损伤的机理与实质,以及茵陈蒿汤的肝损伤防治机理,从药物代谢组学角度对经典方剂防治肝损伤给出全新解释。

关键词:UPLC-Q-TOF/MS 代谢物组学 生物标记物 茵陈蒿汤 肝损伤

代谢物组学作为后基因时代的一种全新的组学技术,以生物体内低分子量物质的动态规律变化来表征生物体的生理病理变化趋势,最终,通过还原相关联生物事件揭示生物体的病理生理变化实质和机理所在^[1]。代谢组学在药物研究中主要应用于药物代谢、药物毒性筛选和作用机制研究^[2]。CCL₄ 诱导肝损伤模型是药物研究中常用的动物模型,其检测指标多为反映肝细胞损伤程度的酶学指标,如谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)等。但应用代谢组学进行相关的研究少有报道,尤其是中药干预作用研究更是

凤毛麟角。茵陈蒿汤出自《伤寒论》,具有利胆、保肝、解热抗炎镇痛、抗菌抗病毒的作用。利胆保肝作用是本方临床治疗多种黄疸主要药理基础^[3]。本研究以茵陈蒿汤和 CCL₄ 诱导肝损伤模型为研究对象,研究 CCL₄ 诱导肝损伤模型及茵陈蒿汤干预后大鼠尿液代谢表型的变化,探讨代谢组学在动物模型复制和中药药效研究中的应用。

一、材料与方法

1. 仪器

美国 Waters AcquityTM UPLC 液相色谱仪(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 microTM 四极

收稿日期:2006-12-15

修回日期:2006-12-19

* 国家重大基础研究发展计划(973)(2005CB523406):基于体内直接作用物质的类方配伍研究,负责人:王喜军。

** 联系人:王喜军,教授,本刊编委,博士生导师,研究方向:中药及复方的血清药物化学研究。Tel:0451-82110818, Email:wxj@hljucm. ent

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 高速冷冻离心机。

2. 药品与试剂

乙腈为色谱级,美国迪马公司;去离子水,本室 Milli-Q 纯水机制备;甲酸色谱级,美国霍尼韦尔公司;脑啡肽, SIGMA 公司; CCL₄ 为分析级,中国北京化工厂。茵陈蒿汤冻干粉(YCHT),实验室自制。

3. 动物

Wistar 大鼠,雄性,体重 220~260g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。大鼠于室内保持 12h 光照, 12 h 避光循环饲养,给予标准饲料和饮用水,且控制室内相对湿度在 40% 左右。

4. 样品采集与制备

20 只大鼠,随机分为模型组(口服 20% CCL₄ 油溶液 1mL/kg)和茵陈蒿汤组(口服茵陈蒿汤冻干粉 8g/kg)。实验按表-1 方案进行。每日下午 6 点灌胃给药 1 次,连续 5d,用代谢笼收集 12h 尿液,停药后,每天继续收集 12h 尿液至第 8 天,尿液置于冰中保存。尿液样品于 4℃, 13000rpm 离心 5min,取上清液过 0.22μm 微孔滤膜,供 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

5. 分析条件

(1) 色谱条件。

色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ column (50mm × 2.1mm i. d., 1.7μm, Waters Corp, Milford, USA); 流速: 0.40mL/min; 柱温: 45℃; 流动相: A: 0.1% 甲酸乙腈, 流动相 B: 0.1% 的甲酸水溶液; 梯度洗脱程序(表 2)。二极管阵列紫外检测器全波长扫描,紫外检测器流出液不经分流直接导入质谱系统检测。

(2) 质谱条件。

电喷雾离子源(ESI),采用正离子模式检测;脱溶剂气流量为 600L/h,脱溶剂气温度为 300℃,锥孔气流量为 100L/h,离子源温度为 110℃,毛细管电压为 3200V,锥孔电压为 35V,微通道板电压为 2300V。每 0.14s 采集一次谱图;准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, [M+H]⁺ = 556.2771) 溶液为锁定质量溶液。质量扫描范围: m/z 100~900。

表 1 梯度洗脱程序表

天数	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
模型组	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	CCL ₄	-	-	-
茵陈蒿汤组	H ₂ O	YCHT	YCHT	YCHT	CCL ₄ + YCHT	-	-	-

表 2 梯度洗脱程序表

时间 (min)	A/%	B/%	curve
Initial	98	2	Initial
2	98	2	11
3	80	20	6
7	5	95	6
9	5	95	11
11	98	2	6
13	98	2	11

6. 数据处理

数据采用 Micromass MarkerLynx 软件进行色谱峰识别以及峰匹配,并采用主成分分析法(PCA)对各组大鼠尿液的代谢组进行分析。

二、结果及讨论

1. 大鼠尿液分析条件的优化

本实验用色谱柱采用 1.7μm 填料使得 UPLC 在较高的线速度下依然可以保持良好的分离效率,为节省分析时间及考虑到质谱系统对流量的耐受性,故采用 0.40mL/min 的流速能够满足分离要求并提高分析通量,同时可不经分流将流出液直接导入质谱系统进行检测。对于尿液这种复杂的生物样本,梯度洗脱是一种较为理想的选择。质谱条件中脱溶剂气流量以及

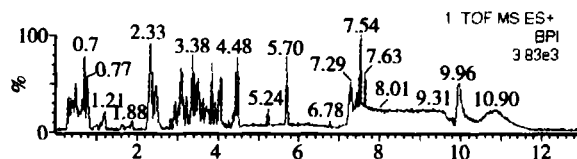


图 1 大鼠尿液代谢产物典型 UPLC-Q-TOF/MS BPI 轮廓图

温度对代谢物的离子化效率有较大影响,故优化检测条件时重点考察这两个参数。在优化后的分析条件下(1.5项下),应用此条件取得了良好的分析效果(图1)。

2. CCL_4 对大鼠尿液代谢物色谱图的影响

分析比较模型组大鼠8天尿液的UPLC-Q-TOF/MS BPI轮廓图(图2),发现第5天口服给与 CCL_4 油溶液后,大鼠尿液代谢物组发生了明显的变化,到第6天时达到最大值,第8天有向正常代谢物组回复的趋势,这与单剂量 CCL_4 致肝损伤模型的作用趋势相吻合,可佐证本次实验造模成功。

3. CCL_4 诱导大鼠肝损伤模型生物标记物的确定

采用主成分分析的方法,对模型组大鼠不同天数的尿液的代谢指纹数据进行分析,绘制出反映组间离散程度的Score plot(图3)及标示离子对离散趋势贡献程度的Loading plot(图4)。对图3进行分析可知口服给予 CCL_4 后大鼠尿液代谢物组发生了明显的变化,与给 CCL_4 前相比明显被分类,且这种变化在第6天时达到最大值。从而发现口服给予 CCL_4 后大鼠尿液代谢物组发生变化且被明显分为两类,说明给予 CCL_4 后大鼠正常生理代谢被干扰,从代谢物组变化的角度科认为 CCL_4 肝损伤模型造模成功。采用PCA的方法对大鼠代谢指纹数据进行分析,根据主成分载荷因子可知何种代谢物对分类贡献最大,这种代谢物可被认为是 CCL_4 对大鼠生化代谢产生影响的生物标记物。本研究除考虑代谢物对分类贡献大小外,还兼顾了代谢物在空白和模型大鼠尿液中的含量变化趋势。应用此方法找到了5个具有显著分类意义的 CCL_4 致肝损伤模型的生物标记物(表3;图5)。

采用TOF/MS的方法测定标记物的精确质量,得到测定误差范围内的相应化合物的元素组成和相应化合物不饱和度;通过分子式或分子质量检索化合物数据库,得到可能的化合物结构,再结合MS/MS数据筛选出最有可能的一种或几种化合物,最终通过与对照品对比色谱保留行为以及MS/MS数据来确定标记物的化学结构。

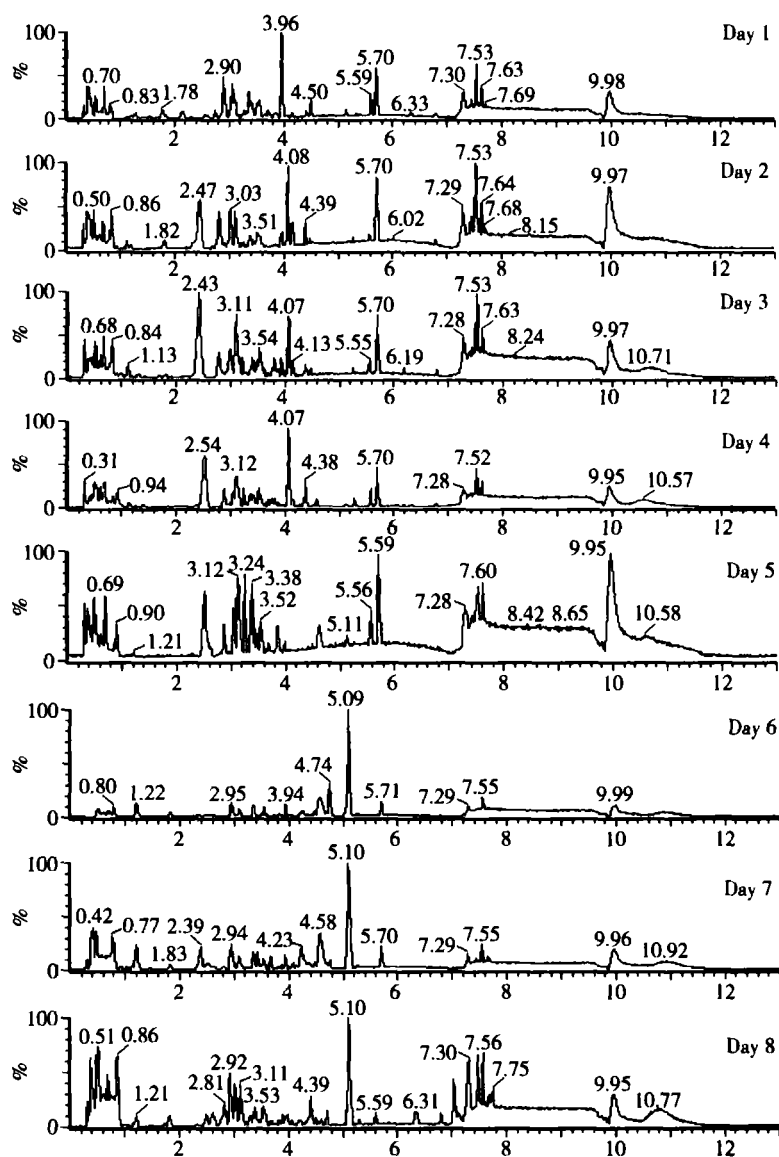


图2 模型组大鼠尿液中代谢产物正离子模式UPLC-Q-TOF/MS BPI轮廓图(连续8天)

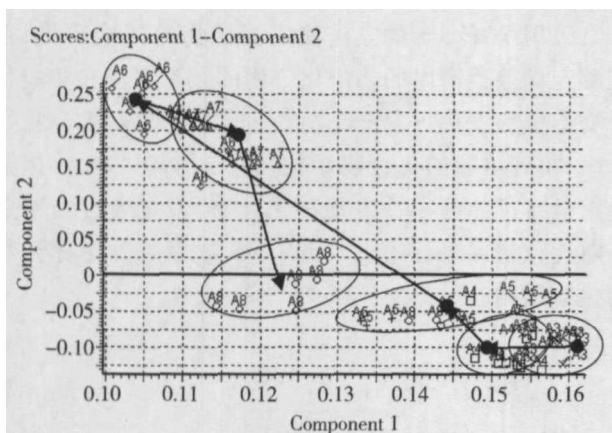


图3 模型组大鼠尿液中代谢产物的 Score plot 图

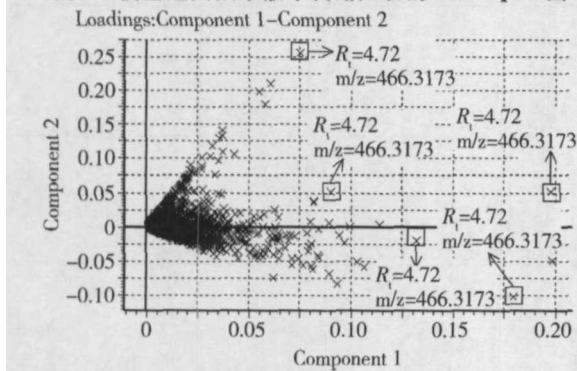


图4 模型组大鼠尿液中代谢产物的 Loading plot 图

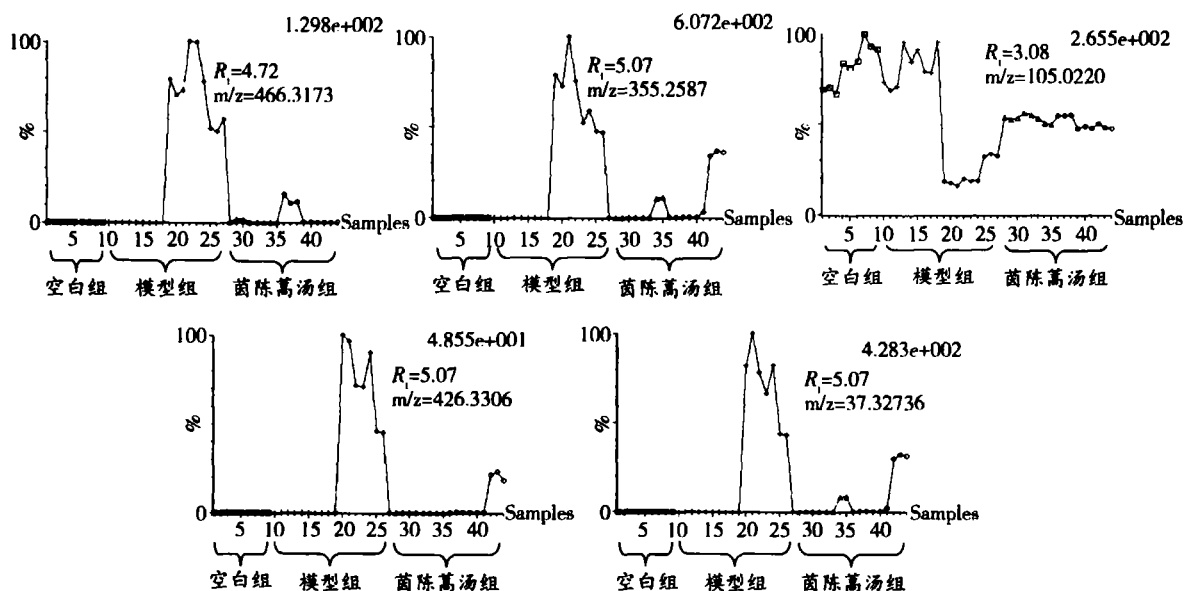


图5 大鼠尿液中5个特异性生物标记物 Trend plots 图

通过主成分分析发现 $R_t = 4.72$ 、 $[M+H]^+ = 466$ 的离子对分类贡献较大。代谢物 $[M+H]^+$ 的 m/z 为 466 的化合物的准确的相对分子质量为 466.3173, 可推测该化合物含有奇数个 N 原子。在测定误差 5ppm 内, 可得到分子式为 $C_{26}H_{43}NO_6$, 计算其不饱和度为 6, 提示该代谢物有环状结构。MS/MS 分析给出的主要碎片离子为 448、430、412 和 338 (图 6)。其中碎片离子 448、430、412 分别为 $[M+H]^+$ 峰连续失去 1 分子 H_2O , 338 为 412 离子峰失去 $C_2H_4NO_2$ (甘氨酸残基)。通过检索数据库认为该代谢物最有可能是 Glycocholate ($C_{26}H_{43}NO_6$, $m/z = 465.3089$)^{*}。其他标记物的信息见表 3。

4. 茵陈蒿汤对 CCL_4 导致大鼠肝损伤模型代谢物组变化的影响

大鼠口服给与茵陈蒿汤 4 天后再给与模型药物, 2.3 项下所述 5 个生物标记物与空白组比较除个别大鼠外均无变化或无明显变化 (图 5), 在 Score plot (图 7) 中所有样品聚于一类, 样品间代谢物组无明显差异, 说明茵陈蒿汤对 CCL_4 导致大鼠肝损伤模型具有预防作用。

* Kyo to Unive rsity Bioinfo rmatics Center. <http://www.genom e.ad.jp/kegg/>, 2005207

表 3 大鼠尿液中特异性生物标记物量化信息表

编号	保留时间 (min)	正离子模式 (m/z)		元素组成
		测量值	理论值	
1	4.72	466.3173	466.3169	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆ (Glycocholate)
2	5.07	355.2587	355.2597	C ₁₉ H ₃₄ N ₂ O ₄
3	3.08	105.0220	105.0188	C ₃ H ₄ O ₄
4	5.07	426.3306	426.3372	C ₂₈ H ₄₃ NO ₂
5	5.07	373.2736	373.2743	C ₂₄ H ₃₆ O ₃

三、结 论

疾病模型的指标往往局限于从一个或几个疾病本身所表现出现象中去选择,忽略了疾病对机体整体的影响,这样选择的指标不能全面地反映机体疾病的状态。代谢物组学从整体观出发,以机体代谢物组变化为载体,试图全面的解析疾病对机体的影响,从而选出能反映机体整体状态的内源性代谢物作为疾病的检测指标。本课题应用代谢物组学的方法研究了经典的 CCL₄ 急性肝损伤模型,确立了 5 个生物标记物,从整体观出发为模型选择了能反映机体整体状态的检测指标,弥补了常规指标的缺陷。

与常规指标相比,代谢组学分析具有许多优势。其一,代谢组学分析的灵敏性大大高于其常规检验方法;其二,代谢组学分析具有简单、快速、无创伤等特点。尿液 UPLC-MS 分析 1 个工作日可完成约 150 个样品的处理、测定和分析,能满足药物早期毒性筛选的要求;尿液分析不仅对动物无创伤性,且不受采样时间和频率的限制,可进行动态的分析和检测,有望广泛地应用于药物筛选和疾病诊断。

通过本研究将代谢物组学的研究方法成功的应用于中药研究中,在对经典动物模型研究的同时,为中医症候模型的复制提供了全新的研究思路。

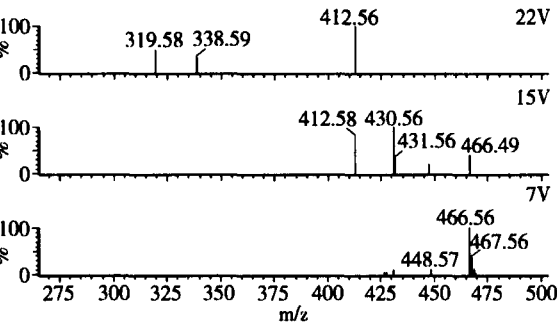


图 6 确定性生物标记物 Rt=4.72、[M+H]⁺=466 多级质谱图

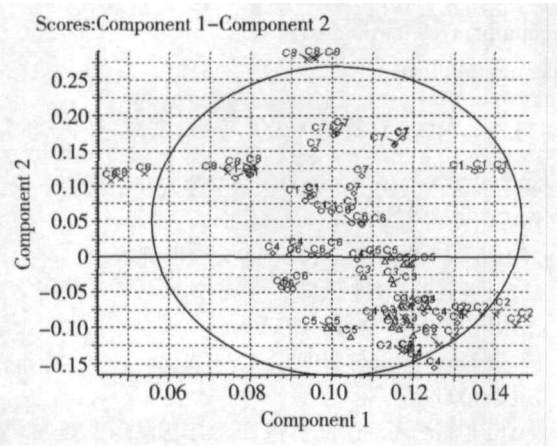


图 7 口服茵陈蒿汤提取物组大鼠不同时间的尿液中代谢产物的 Score plot 图

参考文献

- 1 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181 - 1189.
- 2 Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153 - 161.
- 3 Cao Yi; Dong Zibo; Zhu Quan: The Protection of Yinchenhao Tang to Rat's Damaged Liver. *Journal of Zhejiang College of Tcm*, 2002, 26(1): 41 - 43.

Metabonomics of CCL₄ - Induced Rat Liver Injury and Interfering Effects of the Yin Chen Hao Tang Extract

Wang Xijun, Sun Wenjun, Sun Hui, Lu Haitao, Zhou Dixin, Wu Zeming, Wang Ping, Liu Lian, Wu Xiuhong
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

This paper discusses the metabonomics of rat liver injury induced by CCL₄, and the interfering effects of the Yin Chen Hao Tang Extract. In the study, five special biomarkers of rat liver injury were discovered, using the MS analytical theory and PCA (principal components analysis) software. Both the mechanism of liver injury, and the therapeutic mechanism of the Yin Chen Hao Tang Extract have been sorted out, under the guidance of the systems biology. The investigation has led authors to believe that metabonomics makes a fine approach for explaining the therapeutic effects of traditional Chinese medicine on treating liver injury.

Keywords: UPLC - Q - TOF/MS, metabonomics, biomarker, the Yin Chen Hao Tang, liver injury

(责任编辑:王 瑀, 责任编辑:张志华, 责任译审:邹春申)

(Continued from Page 100)

Metabolism of Icaritin and Icariside II by Rat Intestinal Bacteria In Vitro

Xu Wen¹, Zhang Yaping¹, Zhang Weidong^{1,2*}, Zhang Xinmin³, Shen Ziyi³
(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433;
2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201203;
3. Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040)

The purpose of this study is to understand the metabolism of icaritin and its main metabolite icariside II by rat intestinal bacteria in vitro, creating a basis for further study of oral icaritin absorption. In the study, Icaritin and icariside II were incubated together with rat intestinal bacteria at a temperature of 37 °C. An HPLC method was used for simultaneous determination of Icaritin and icariside II. It is found that Icaritin is rapidly metabolized to icariside II, though icariside II is not touched. The finding suggest that it is important to understand the metabolism and absorption mechanism of icariside II, in an attempt to better understand the oral absorption mechanism of icariside II.

Keywords: Icaritin, Icaritin; icariside II; rat intestinal bacteria; metabolism

(责任编辑:王瑀, 责任编辑:张志华, 责任译审:邹春申)

《中国新药杂志》征订启事

中国科技核心期刊、中国药学核心期刊、中国期刊方阵“双效”期刊!

主办单位:中国医药科技出版社/中国医药集团总公司/中国药学会。

1992年元月正式公开发行,半月刊。所刊文章被《美国化学文摘(CA)》、《万方数据-数字化期刊群》、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库等国内外权威检索期刊或数据库收录。辟有综述与专论、实验研究、临床研究、新药述评、信息快递、药品管理等栏目。读者群多为从事医药研发、生产、经营、管理的单位,从事医药情报资料工

作的高中级医药卫生工作者及医药卫生院校的师生。欢迎投稿! 积极订阅! 刊登广告!

大16开本,每期定价10元,全年240元。

邮发代号:82-488 国外代号:M4240

国内统一刊号:CN11-2850/R

国际标准刊号:ISSN 1003-3734

邮编:100088

地址:北京市海淀区知春路20号中国医药大厦703室

《中国新药杂志》编辑部

电话:010-82358308 62359357/82089057(兼传真)

E-mail: cndj@newdrug.cn xyzz711@sohu.com