

冷应激及其药物干预的代谢组学研究^{*}

王晓艳 邱云平 苏明明 赵爱华 贾伟^{**}

(上海交通大学系统生物医学研究院 上海 200240)

周明眉 (上海中医药大学中医方证与系统生物学研究中心 上海 201203)

摘要:采用衍生化 GC/MS的方法分析尿液中内源性小分子代谢物,结合主成分分析、最小二乘法等模式识别方法计算峰响应信号,冷应激前后正常大鼠尿液内源性代谢物在主成分分析图上产生显著分离,人参皂苷组则冷应激前后几乎无分离。利用单维统计对差异物质加以检验,发现其中与应激相关的代谢物如酪氨酸、色氨酸等物质的相对含量产生显著变化,据此推测机体对冷刺激的应答以及应激后自我调节的过程,而这些物质中绝大多数在人参皂苷组中变化的显著性降低或者已无显著性。本文从代谢物的角度证实冷应激对动物机体的影响、机体的自我恢复以及人参皂苷的抗应激作用。

关键词:冷应激 代谢组学 人参皂苷 GC-MS 主成分分析 偏最小二乘法 -判别分析

环境温度剧烈变化、疼痛、饥饿、疲劳均可引起机体的应激反应,急性应激可以短暂地影响机体,一旦应激原的作用终止后,体内的内稳态将得到自动恢复,目前对这一过程的研究很少。因为单次应激是应激研究的基础,所以我们选择寒冷刺激作为应激原对正常大鼠和预先服用人参皂苷的大鼠同时进行刺激,研究应激导致代谢调控网络的变化,以及人参皂苷对机体应激反应的影响。

本研究尝试建立一种急性冷应激的代谢组学评价方法,采用氯甲酸乙酯衍生化 GC/MS的分析方法测定冷应激前后大鼠的尿样,得到尿中小分子代谢物的图

谱,结合主成分分析、偏最小二乘法等多维和单维统计分析方法的处理,考察小分子内源性代谢物受冷应激影响而产生的变化,结合已有的知识解释这些变化产生的机制,以此来研究冷应激和人参皂苷抗应激作用。

一、材料与仪器

1. 实验动物

洁净级 SD 雄性大鼠 14 只,200~250 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,大鼠于室内保持 12h/12h 昼夜并给予标准饲养,控制室内相对湿度为 40% 左右。

2 试剂及药品

人参总皂苷 (>95.0%) 购自杭州绿天生物技术

收稿日期:2007-06-23

修回日期:2007-06-26

* 国家自然科学基金项目(30572286):基于代谢组学的肾虚证本质的研究,负责人:蒋健。

** 联系人:贾伟,博士,教授,主要从事代谢组学与中医药现代化研究, Tel: 021-62932292, E-mail: weijia@sjtu.edu.cn

有限公司,其它分析试剂 (>99.5%)购自国药集团化学试剂有限公司。

3. 仪器

气相色谱-质谱联用仪 (5975 Inert,安捷伦科技有限公司)

二、方法与结果

1. 急性应激模型的建立和样本采集

大鼠经过 2 周适应后,实验前 1 天设为第 0 天,将动物随机分成空白组和人参组。从第一天开始空白组给予生理盐水,人参组给予人参皂苷的生理盐水溶液,按照 100mg/kg 的标准,每日 1 次,连续 21 日,于第 14 天上午 8:30 至 10:30 之间将冰冻和人参组动物全部置于 -10℃ 中 2h,之后所有动物进入代谢笼。分别于 13,14 天将所有动物置于代谢笼中,收集冷应激前后各 24h 尿液。记录尿液体积,将得到的尿液 8000 rpm 离心,取上清液分装,置于 -70℃ 低温冰箱待测。

2. 进样前衍生化和 GC/MS 分析

采用氯甲酸乙酯 (ECF) 衍生化 GC/MS 方法测定大鼠尿液中的内源性代谢物,该方法经多次检验,重复性好、灵敏度高,适用于代谢组学研究的高通量尿液样本检测^[1,21]。

图 1 中 A 和 B 分别是冷应激前和冷应激后 SD 大鼠尿液典型 GC/MS 谱,可以发现大鼠在冷应激前后,尿液组成的成分和比例上发生了较明显的变化。图 2

中 A 和 B 分别是服用人参皂苷组大鼠冷应激前和冷应激后尿液典型 GC/MS 图谱,可初步判断给予人参皂苷干预组大鼠在冷应激前后,尿液组成的成分和比例上没有明显的变化。

3. 数据处理和模式识别

将得到的样品的 GC/MS 总离子图谱文件通过数据转换、峰辨识、对齐及内标扣除和归一化等计算过程,最终得到一个由指定的峰序列号、观测点以及归一化后的峰强度组成的三维矩阵,将其导入 SIMCA-P11.0 软件中经过中心化,标准化后进行主成分分析 (PCA),以观察样品的聚集、离散及离群点,利用偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 用于鉴别造成聚集和离散的主要差异变量。多维统计方法由于同时受相关性和组内组间方差等因素的影响,有时找到的差异表达的变量可能单维上差异并不十分显著,因此必须在单维统计水平以非参数检验 (K-W 检验) 和单因素 ANOVA 分析的 p 值 (<0.05) 为验证的标准。

如图 1C 所示 (PCA 得分图上的任一点表示一个对应的样本),冷应激前后两组大鼠的尿液样本可以在 PCA 得分图的 PC1 维上明显区分开来,提示大鼠冷应激是造成机体的代谢网络发生明显变化的主要影响因素。我们计算了 PLS-DA 模型的回归系数,以其大小判断变量对模型的贡献,同时在单维统计水平上加以验证,确定最终的差异变量,在 NIST 谱库中检索的结果列于表 1。

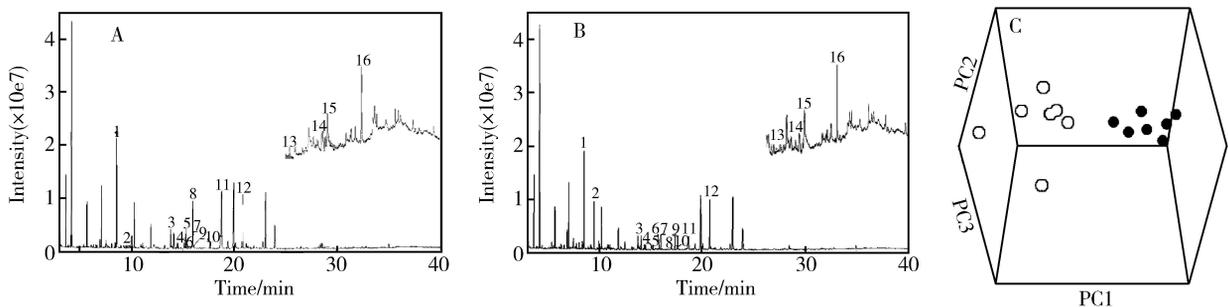


图 1 正常大鼠冷应激前后尿样的 GC/MS 典型图谱和 PCA 模式分析图 (A) 为正常大鼠冷应激前尿液典型总离子图。(B) 为正常大鼠冷应激后尿液典型总离子图;(C) 冷应激前后 PCA 分析 (○表示冷应激之前尿液样本,●表示冷应激之后尿液样本)

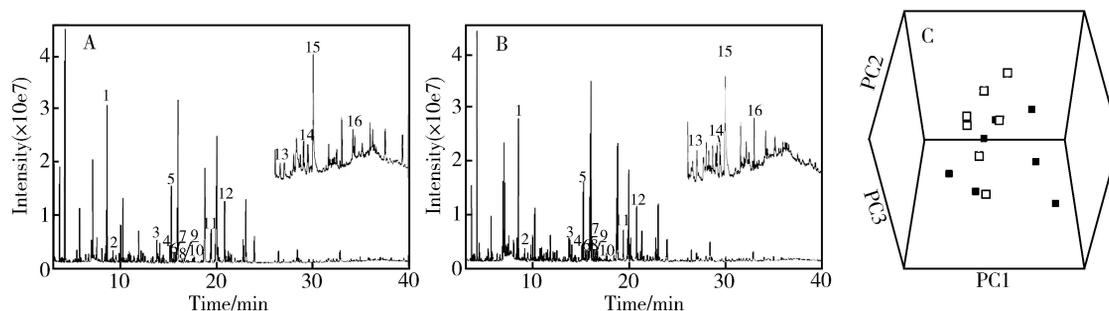


图 2 服用人参皂苷组大鼠冷应激前后尿样的 GC/MS 典型图谱和 PCA 模式分析图 (A) 为冷应激前尿液典型总离子图。(B) 为冷应激后尿液典型总离子图; (C) 冷应激前后 PCA 分析 (□ 表示冷应激之前的尿液样本, ■ 表示冷应激之后的尿液样本)

表 1 由 PLS-DA 模型得到对冷应激与正常状态的区分有贡献的单变量, 分别在冷应激组和人参组以非参数检验 (K-W 检验) 和单因素 ANOVA 分析的 P 值 (<0.05) 为检验的单维统计分析结果

No	代谢物	对照组			人参皂苷组		
		p (Kruskal-Wallis)	p (one-way ANOVA)	变化的方向 (冷应激后比前)	p (Kruskal-Wallis)	p (one-way ANOVA)	变化的方向 (冷应激后比前)
1	甘氨酸 (盐)	0.0351	0.0350		N. S	N. S	
2	4-甲基-苯酚	0.0075	0.0127		N. S	N. S	
3	谷氨酰胺 (盐)	0.0001	0.0027		0.0080	0.0060	
4	异柠檬酸 (盐)	0.0339	0.1102		N. S	N. S	
5	乌头酸 (盐)	0.0295	0.0127		0.0441	N. S	
6	烟酸 (盐)	0.0268	0.0476		N. S	N. S	
7	天冬氨酸 (盐)	0.1547	0.0476		0.0354	N. S	
8	4-羟基苯乙酸 (盐)	0.0066	0.0060		N. S	N. S	
9	柠檬酸 (盐)	0.0174	0.0127		N. S	N. S	
10	谷氨酸 (盐)	N. S	0.0476		N. S	N. S	
11	马尿酸 (盐)	0.0323	0.0127		N. S	N. S	
12	高香草酸 (盐)	0.0135	0.0127		N. S	N. S	
13	多巴胺 (盐)	0.0261	0.0253		N. S	N. S	
14	5-羟吲哚乙酸 (盐)	0.0156	0.0027		N. S	N. S	
15	酪氨酸 (盐)	0.0427	0.0476		N. S	N. S	
16	色氨酸 (盐)	0.0153	0.0253		N. S	N. S	

由于人参皂苷在 GC/MS 样品前处理过程中不能被衍生, 所以可以排除人参皂苷成分代谢物对测定及后续数据处理的干扰。采用相同的 PCA, PLS-DA 进行处理。结果显示, 与单纯冷应激组完全不同, 人参皂苷组动物冷应激前后两天即 13 和 14 天的尿样在 PCA

得分图上聚集在一起, 不能分离, 见图 2C。单维统计结果显示, 空白组的差异表达代谢物在给予人参皂苷干预后的冷应激刺激前后, 绝大多数变化的显著性降低或者已无显著性。这提示人参皂苷对动物机体代谢物由于冷刺激的影响有一定的保护作用。

三、讨论

本研究的主要目标有两个：第一是研究单次冷应激对机体系统代谢产生的影响，第二，从代谢物的角度证明人参可以降低冷应激对机体的影响，从而进一步验证系统代谢物产生冷应激应答。因为是研究应激反应，收集血样的过程本身可对动物产生另一种应激，收集尿液对机体没有任何刺激，尿液可以反映一段时间内血浆的情况，所以尿液比血浆更稳定地表征机体的物质代谢的状况，而且可以关注机体随时间变化的动态过程。经过对尿液的测定和分析后，我们发现经过冷冻刺激后大鼠尿液中很多物质的相对含量发生变化。通过这些代谢物的变化可以推断下列过程：

1. 冷应激导致机体上游代谢通路的变化

冷冻应激后，作为体内儿茶酚胺类物质（去甲肾上腺素和肾上腺素等）的前体，酪氨酸和多巴胺显著降低，而同时高香草酸（儿茶酚胺类物质的代谢物之一）显著升高。这些变化显示交感神经系统（SNS）活动加强，导致了儿茶酚胺类代谢通路上调，见图 3(A)。冷应激后尿液中谷氨酸和天冬氨酸的增加，同时谷氨酰胺和甘氨酸的浓度降低，这也是糖皮质激素升高的信号，见图 3(B)。糖皮质激素可以上调兴奋性氨基酸，如天冬氨酸、谷氨酸，下调抑制性神经介质如 γ -氨基丁酸、甘氨酸和谷氨酰胺^[3, 4]。

冷应激导致的这种去甲肾上腺素和糖皮质激素的增加对于机体利弊并存，一方面它们可以动员整个系统抵御外来刺激，但另一方面抑制免疫、损害内分泌系统、海马和血-脑屏障^[3, 5]。因此，必须需要保护性的

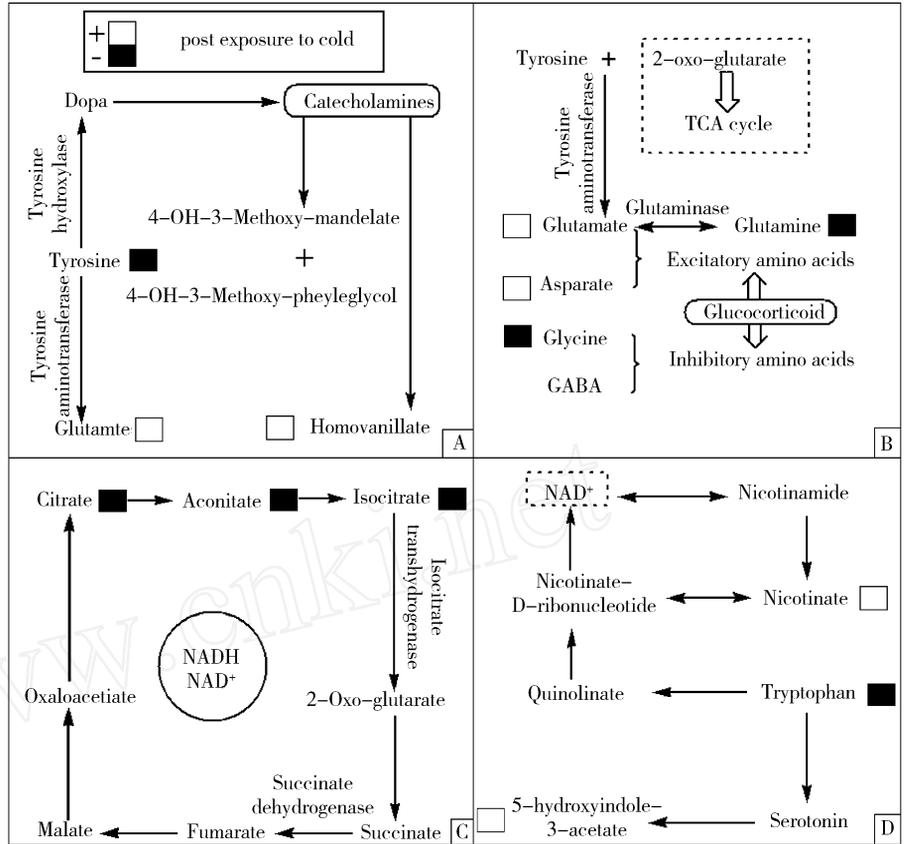


图 3 冷应激影响的体内代谢物以及相关通路的变化 (A)酪氨酸相关的代谢通路；(B)糖皮质激素相关的兴奋/抑制性氨基酸的代谢通路；(C)三羧酸循环相关的代谢通路；(D)色氨酸相关的代谢通路。空方框表示冷应激后增加的物质，黑方框表示冷应激后降低的物质

调节机制来纠正这种损害，包括机体自身补偿调节和外源性保护，如人参干预。

2 机体自身的补偿调节作用

我们认为随时间变化的尿液中的代谢可以反映体内的有组织的互相影响的生理变化以应答冷刺激。从PLS-DA的结果可以发现体内三羧酸（TCA）循环中的柠檬酸，异柠檬酸和乌头酸的含量降低，这看起来似乎与冷应激时升高的能量代谢相矛盾。但是通过分析，我们发现这些被干扰的生化反应实际上可以分为两个阶段：第一个阶段，冷暴露的过程中，因为肾上腺素能神经的活性可以增加TCA循环的关键酶的活性，如异柠檬酸转氢酶、脱氢酶和琥珀酸脱氢酶^[6, 7]，因而

使得 TCA 循环加速,各种反应物和产物过度消耗;第二阶段,当动物结束冷暴露回到代谢笼以后,它们几乎都表现出疲倦、不活跃,标志着它们的能量消耗进入一个相对缓慢过程,逐渐恢复正常。据此可以推测:机体恢复平衡期间的补偿性的变化使得我们观测到的各种反应物的含量降低。

另外,两个色氨酸的代谢物:烟酸和 5-羟(基)吲哚-3-乙酸,在尿液中的含量显著升高,显示冷应激造成色氨酸的代谢增加,见图 3(D)。通过前段的分析,我们知道冷暴露过程中 TCA 循环增加,其中不可缺少的物质-电子转移体(NADH和 NADPH)将随之增加,作为前体物质尼克酰胺也随之增加^[8],但是到了能量代谢低的时候,多余的尼克酰胺便将转化成为烟酸。另一方面,增加的 SNS 可以刺激体内的脂肪特别是褐色脂肪组织分解加速^[9]。因为烟酸可以抑制血中的游离脂肪酸^[10],因此分解产生的游离脂肪酸本身可能刺激机体产生更多烟酸,这种过程可延续至冷应激过后。所以,我们认为烟酸代谢的变化也反映了机体在受到扰动后,恢复平衡的动态调节过程。

3. 人参皂苷的干预作用

自古以来,人参就被作为抗应激的草药使用。现代药理学认为,人参对于机体糖皮质激素, SNS 和免疫系统具有调节的作用^[11,12],作为人参的重要药效物质之一,人参皂苷 Rg1,具有调节脑中糖皮质激素受体的作用^[13]。另一个重要成分 Rb1 能够拮抗冷应激带来的免疫抑制并且下调血浆皮质酮水平^[14]。人参皂苷也可以调节兴奋性和抑制性神经递质的量,从而保护机体不受过量谷氨酸的损伤^[15]。我们认为人参是通过调节糖皮质激素等上游代谢通路,既而改变下游的物质变化,达到抗冷应激的作用。

4. 胃肠道菌群的代谢物的变化

冷应激还影响到尿液中 4-甲基苯酚,4-羟基苯乙酸和马尿酸,这些物质都被认为是胃肠道菌群的代谢物^[16,17]。这提示菌群也参与到冷应激的过程中。神经内分泌递质如去甲肾上腺素与菌群共生于胃肠道^[18],因此应激产生的这些内分泌递质的变化将影响到天然的菌群^[19]。同时,这些内源性物质的变化也是应激过程中胃肠道动力和分泌的结果^[20]。值得注意

的是,在人参组中,与菌群相关的代谢物的变化也不显著。因为人参为口服给药的,大部分皂苷都是在肠道内被降解,吸收^[21]。可以据此推测人参皂苷在被菌群降解的同时本身也会调节这些胃肠共生体。这样以来,人参对于机体的抗应激作用可以被延伸至肠道菌群。我们推测生物体和肠道菌之间在代谢调控应答方面有着紧密的联系,机体的共生菌群可以被看作一个特殊的“器官”。

四、结 论

本文采用衍生化气相-质谱联用结合模式识别以及单多维统计数学处理方法考察了单次冷应激前后正常大鼠和服用人参皂苷大鼠的 24 小时尿液。采用多维与单维统计结合的方法,找到与正常大鼠冷应激前后分组相关的物质,发现其中与应激相关的部分代谢物的相对含量产生显著变化,从这些变化的物质可推测动物机体多个系统对冷应激的应答以及应激后自我调节的过程,而这些物质中绝大多数在人参皂苷组中变化的显著性降低或者已无显著性。

因此尿液代谢组学的方法可以用于评价冷应激,并可证实冷应激对机体物质代谢的影响、机体的自我恢复以及人参皂苷的抗应激作用。

参考文献

- 1 Qiu Y, Su M, Liu Y, et al Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography - mass spectrometry based metabolomic profiling *Analytica Chimica Acta* 2007, 583: 277 ~ 283.
- 2 Li H, Ni Y, Su M, et al Pharmacometabolomic phenotyping reveals different responses to xenobiotic intervention in rats *J Proteome Res* 2007, 6 (4): 1364 ~ 1370.
- 3 McEwen BS The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance *Brain Res* 2000, 886 (1 - 2): 172 ~ 189.
- 4 Venero C, Borrell J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats *Eur J Neurosci* 1999, 11 (7): 2465 ~ 2473.
- 5 Topy DJ, Chrousos GP. The three - way interactions between the hypothalamic - pituitary - adrenal and gonadal axes and the immune system. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996, 10 (2): 181 ~ 198.
- 6 Kulinskii V I, Medvedev A I, Kuntsevich A K. Stimulation of mitochondrial oxidative enzymes in acute cooling and its catecholamine mechanisms

- Vopr Med Khim.* 1986, 32 (5) 84 ~ 88.
- 7 Lapsha V I, Ekinova M. Cytophotometric study of catecholamines and energy metabolism enzymes in the neurons of the rat celiac plexus during cold and emotional stresses *Neirofiziologiya.* 1988, 20 (6) 743 ~ 749.
 - 8 Fedyk M, Velykyi MM, Zababurina ML, *et al* The dynamic biosynthesis of nicotinamide coenzymes from nicotinamide and nicotinic acid in rat tissues *Ukr Biokhim Zh.* 1996, 68 (2) 29 ~ 33.
 - 9 Yoshimatsu H, Tsuda K, Nijima A, *et al* Histidine induces lipolysis through sympathetic nerve in white adipose tissue *Eur J Clin Invest* 2002, 32 (4) 236 ~ 241.
 - 10 Martineau L, Jacobs I Effects of muscle glycogen and plasma FFA availability on human metabolic responses in cold water *J Appl Physiol* 1991, 71 (4) 1331 ~ 1339.
 - 11 Yuan WX, Wu XJ, Yang FX, *et al* Effects of ginseng root saponins on brain monoamines and serum corticosterone in heat - stressed mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1989, 10 (6) 492 ~ 496.
 - 12 Sugimoto M, Kikuchi S, Arita M, *et al* Large - scale prediction of cationic metabolite identity and migration time in capillary electrophoresis mass spectrometry using artificial neural networks *Analytical Chemistry.* 2005, 77 (1) 78 ~ 84.
 - 13 Chung E, Lee KY, Lee YJ, *et al* Ginsenoside Rg1 down - regulates glucocorticoid receptor and displays synergistic effects with cAMP. *Stemoids* 1998, 63 (7 - 8) 421 ~ 424.
 - 14 Luo YM, Cheng XJ, Yuan WX. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb1 on immunity in cold water swim stress mice and rats *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1993, 14 (5) 401 ~ 404.
 - 15 Kimura T, Saunders PA, Kim HS, *et al* Interactions of ginsenosides with ligand - bindings of GABA (A) and GABA (B) receptors *Gen Pharmacol* 1994, 25 (1) 193 ~ 199.
 - 16 Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea *Gut* 2004, 53 (1) 58 ~ 61.
 - 17 Dumas ME, Barton RH, Toye A, *et al* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin - resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103 (33) 12511 ~ 12516.
 - 18 Lyte M, Bailey MT. Neuroendocrine - bacterial interactions in a neurotoxin - induced model of trauma *J Surg Res* 1997, 70 (2) 195 ~ 201.
 - 19 Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev.* 2004, 9 (2) 180 ~ 197.
 - 20 Thompson DG, Richelson E, Malagelada JR. Perturbation of upper gastrointestinal function by cold stress *Gut* 1983, 24 (4) 277 ~ 283.
 - 21 Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins II The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rg1 in the rat *Chen Pham Bull (Tokyo).* 1983, 31 (1) 292 ~ 298.

Metabonomic Study on Acute Cold Stress and Ginsenosides Intervention

Wang Xiaoyan, Qiu Yunping, Sun Mingming, Zhao Aihua, Jia Wei

(Shanghai Jiao Tong University, System Biomedicine Center, Shanghai, 200240)

Zhou Mingmei

(Shanghai Traditional Chinese Medicine University, 201203)

Acute stress may trigger systemic biochemical and physiological changes in living organisms, leading to a rapid loss of homeostasis, which can be gradually reinstated by self - regulatory mechanisms and/ or drug intervention strategy. Urinary metabolite profiling of Sprague - Dawley rats exposed to cold temperature (- 10 ℃) for 2 h using derivatized GC/MS in conjunction with modern multivariate statistical techniques revealed drastic biochemical changes as evidenced by fluctuations of urinary metabolites and demonstrated the protective effect of ginsenosides on stressed rats. The metabolomics approach enables us to visualize significant alterations in metabolite expression patterns as a result of stress - induced metabolic responses and post - stress compensation. The protective actions of ginsenosides were verified by reduced variations of endogenous metabolites caused by cold stress.

Keywords: cold stress; metabonomics/atabolomics; GC/MS; principal component analysis (PCA); partial least squares discriminant analysis (PLS - DA); ginsenoside

(责任编辑:王 瑀,郭 屹,责任译审:贾 伟)