

• 药理与临床 •

基于代谢组学技术的大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制研究

李春雨, 王 平, 王 张, 张 艺, 孟宪丽*

成都中医药大学, 四川 成都 611730

摘要: 目的 利用代谢组学技术探讨大黄治疗慢性肾功能衰竭(CRF)的作用机制。方法 采用腺嘌呤制备大鼠 CRF 模型, 以高分离度快速液相色谱-质谱(RRLC-MS)为核心分析技术, 以主成分分析法为数据解析手段, 筛选出 CRF 特征性内源代谢产物, 探讨大黄治疗 CRF 的作用机制。结果 大黄能减弱或取消外界刺激因素(如腺嘌呤)诱发 CRF, 且对其代谢轨迹的扰动具明显的回调作用, 其作用机制可能与潜在生物标志物有关。结论 大黄通过减少 CRF 大鼠血液中儿茶酚胺类物质生成、磷酸酯类物质分解、炎症介质产生, 使体内 D-谷氨酰胺、D-谷氨酸代谢和蛋氨酸循环恢复正常而发挥治疗 CRF 的作用。

关键词: 大黄; 慢性肾功能衰竭; 腺嘌呤; 代谢组学; 内源性代谢产物

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0312-04

Mechanism study of *Rheum officinale* on chronic renal failure based on metabolomics

LI Chun-yu, WANG Ping, WANG Zhang, ZHANG Yi, MENG Xian-li

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611730, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Rheum officinale* in the treatment of chronic renal failure (CRF) based on metabolomics. **Methods** CRF model of rats was established using adenine. An RRLC-MS method was used for analysis and the data were processed by PCA to acquire characteristic endogenous metabolites and to investigate the mechanism of *R. officinale* on CRF. **Results** *R. officinale* weakened or eliminated the induction of CRF in rats, like adenine, helped obviously normalize the metabolome in rats, which might be associated with the potential biomarkers. **Conclusion** *R. officinale* could cure CRF through decreasing the synthesis of catecholamines compounds, decomposition of phosphate ester compounds, and production of inflammatory mediators in blood and making D-glutamine, D-glutamic acid metabolism, and methionine cycle back to normal.

Key words: *Rheum officinale* Baill.; chronic renal failure (CRF); adenine; metabolomics; endogenous metabolites

慢性肾功能衰竭(CRF)可导致机体代谢紊乱, 其病变程度最终在代谢产物中得以体现^[1]。代谢组学以新陈代谢为切入点, 评价机体的代谢平衡状态, 因此以代谢组学研究 CRF 的机制和药物作用机制具有独特优势^[2]。药理实验和临床实践均已证实大黄是治疗 CRF 的有效药物之一^[3-5]。本实验应用高分离度快速液相色谱-质谱(RRLC-MS)技术, 对给予大黄治疗的 CRF 大鼠的尿样中代谢产物进行分析, 以主成分分析法(PCA)为数据解析手段,

获取尿样分类信息和差异变量, 筛选出标示 CRF 的内源性代谢产物, 探讨大黄治疗 CRF 的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

大黄饮片, 购自四川省中药饮片有限责任公司, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定为药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎。甲酸, HPLC 级, Sigma 公司; 乙腈, HPLC 级, Dikma 公司; MS 质控样品为 Tuning MIX for LC/MSD Ion Trap,

收稿日期: 2011-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001689); 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(06-07JP38)

作者简介: 李春雨(1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药和民族药药效与毒理研究。Tel: (022)84845247 E-mail: wd2526@163.com

*通讯作者 孟宪丽 Tel: (028)61800158 E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn

Agilent 公司。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (300 ± 50) g, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号: SCXK (川) 2004-15。

1.3 仪器

LC—10ATVP 高效液相色谱仪, 日本岛津分析仪器公司; Agilent 6320 Ion Trap RRLC-MS, Agilent 公司。

2 方法

2.1 大黄水煎液制备

大黄饮片 500 g, 加水 5 000 mL, 浸泡 30 min, 煎煮 3 次, 合并 3 次滤液, 减压浓缩至 500 mL, 相当于生药 1 g/mL。经 HPLC 法测定 ($n=3$), 大黄水煎液中主要成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数分别为 10.76、4.00、1.38、1.93、0.55 mg/g。

2.2 分组、造模与给药

78 只大鼠, 随机分为对照组 (10 只), CRF 模型组 (20 只), 大黄高、中、低剂量组。除对照组 ig 给予等容积蒸馏水外, 其余各组大鼠每天空腹 ig 腺嘌呤 (250 mg/kg) 蒸馏水混悬液 1 次, 连续 21 d, 诱发大鼠 CRF^[6]。模型制备成功后, 大黄水煎液高、中、低剂量组 ig 大黄水煎液 2.5、1.25、0.625 g/kg, 连续给药 14 d, 对照组和模型组均 ig 等容积蒸馏水。

2.3 样本采集

于实验第 0、21、35 天收集每只大鼠 24 h 尿液, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于 RRLC-MS 分析。

2.4 RRLC-MS 分析色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸超纯水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱, 0~10 min, 80%A; 10~11 min, 50%A; 11~22 min, 0%A; 22 min 以后, 80%A; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; DAD 检测器全波长扫描, 检测器流出液不经分流直接导入质谱系统检测。

2.5 RRLC-MS 分析质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 采用正、负离子交替扫描模式检测; 干燥气流体积流量 10.0 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾压力 210 Pa; 毛细管电压为 3 500 V。

2.6 数据分析

分析结果的输出形式有得分图 (score plot) 和

载荷图 (loading plot) 两种。通过得分图获得对样本的分类信息, 通过载荷图获得对样本分类有贡献的变量及其贡献大小, 从而发现可作为生物标志物的变量。采用 Mzmine 2 (Version 1.97) 软件进行数据标准化处理, 应用 Metlab 7.0 软件进行模式识别分析, 应用 PCA 和偏最小二乘模式识别分析法 (PLS-DA)^[7-9]。

3 结果

3.1 大鼠尿样的典型总离子流分析

应用预先设定的洗脱程序, 可快速、高效地分离、分析大鼠尿样, 检测到约 2 400 个离子。为保证方法的稳定性, 在分析过程中, 每分析 10 个尿样后随即分析一次质控样品 (该质控样品 $\text{ESI}^+ m/z$: 118.09, 322.05, 622.03, 922.01, 1 521.97, 2 121.93, 2 721.89; $\text{ESI}^- m/z$: 112.99, 431.98, 601.98, 1 033.99, 1 633.95, 2 233.91, 2 833.87)。每次分析的保留时间及峰高的标准偏差分别小于 0.5 min、5%, 满足代谢组学的分析要求, 结果见图 1。

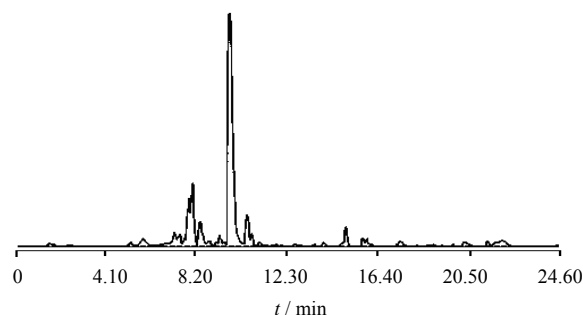


图1 ESI^+ 模式下对照组大鼠尿液典型总离子流图
Fig. 1 Typical TIC chromatogram of urine in rats of control group under ESI^+ mode

3.2 代谢物组图谱的数学解析

经 PCA、PLS-DA 分析后, 对照组、模型组和大黄水煎液高、中、低剂量组药后大鼠尿样代谢产物的 score plot 见图 2-A。可知, 对照组和模型组的代谢产物能明显分离开, 无交叉重叠; 大黄水煎液 2.5、0.625 g/kg 剂量组的代谢产物在给药后未能与模型组分离开, 提示这两个剂量对模型动物代谢物谱的恢复无明显作用。大黄水煎液 1.25 g/kg 剂量组给药后的代谢产物与模型组分离, 提示该剂量对模型动物代谢物谱的改变有回调趋势, 这与前期药效学实验, 即大黄 2.5、0.625 g/kg 剂量改善大鼠 CRF 症状的作用不明显, 而剂量为 1.25 g/kg 时能明显改善大鼠 CRF 症状的结果相一致^[10]。

对所得数据进行PCA和PLS-DA分析得到得分图的同时,也得到治疗后代谢物的载荷图(图2-B),通过Hotelling's T²检验确定有统计学意义的点,其代表的化合物是使CRF与对照组样本产生代谢图

谱差异的主要原因,是潜在的CRF的生物标记物。检索KEGG和METLIN代谢组学数据库,确定的4个组分表示CRF的内源性代谢产物,具体结构见图3。

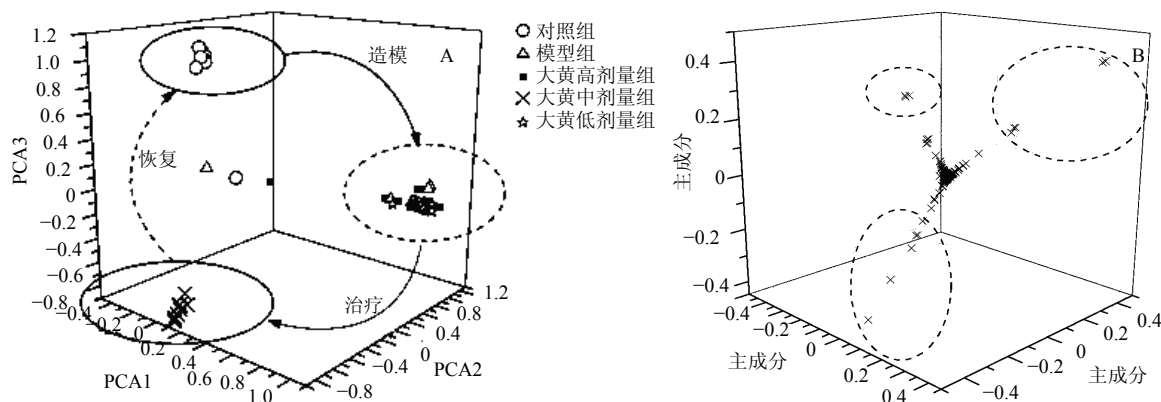
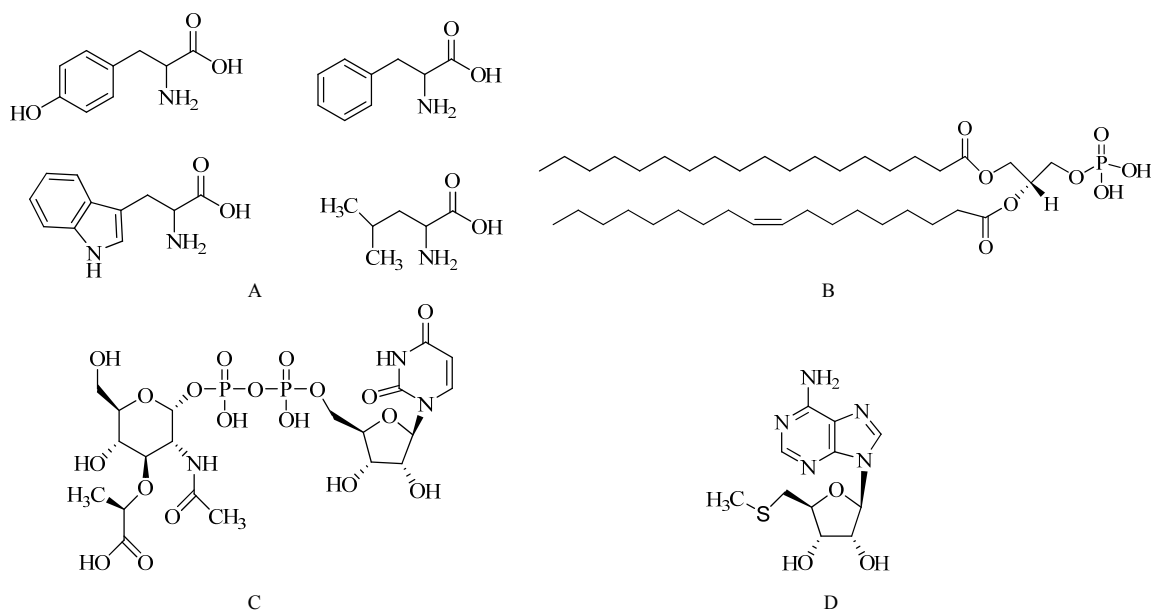


图2 大黄水煎液给药后各组大鼠尿液代谢产物得分图(A)和荷载图(B)

Fig. 2 Score (A) and loading (B) plots of urine metabolites of rats in each group after administration of rhubarb decoction



A-氨基酸水合物(酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸) B-PA(磷酸酯类物质) C-UDP-N-乙酰胞壁酸 D-S-甲基-5'-硫腺嘌呤
A-amino acid hydrate (Tyr, Trp, Phe, and Leu) B-PA (phosphate) C-UDP-N-acetylmuramic acid D-S-methyl-5'-thioadenosine

图3 内源性标志物结构式

Fig. 3 Structures of endogenous markers

4 讨论

本实验用腺嘌呤制备大鼠CRF模型,基于RRLC-MS技术、PCA、PLS-DA等化学计量学方法对给予大黄水煎液的大鼠尿样进行分析,获得CRF的代谢物组信息,为研究疾病发生的分子机制和药

物作用的机制提供更广阔的视角^[11]。根据实验结果,推测大黄给药后使CRF模型大鼠体内发生如下变化:(1)“苯丙氨酸-酪氨酸-儿茶酚胺”代谢途径回归正常状态,血液中儿茶酚胺类物质生成减少,肾脏损伤减轻^[12-14];(2)磷酸酯类物质分解、炎症

介质产生减少,与前期研究所做的病理学结果(肾组织炎性细胞浸润有明显改善)相一致;(3) *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢紊乱的状态有所纠正,血尿素氮水平降低,与前期实验结果相一致;(4) 蛋氨酸循环过程有恢复正常的趋势,导致机体中生物活性物质如肾上腺素、肌酸、肉碱、胆碱等的合成向正常恢复,使肾脏的机能状态有所改善。本研究虽然通过 RRLC-MS 法分析、鉴定了 4 种内源性代谢标志物,但仍存在两个问题:(1) 本研究采用 LC-MS 法对尿样进行代谢组学分析,因目前尚无公认的统一代谢组学数据库,在本实验中对数据库检索的结果进行质核比和保留时间的匹配对照,对于质核比在 ± 0.5 的,在质谱保留时间波动范围为 ± 0.5 min,此后在线性增加容许范围内的波动视为同一种物质。因部分内源性标志物质核比和保留时间相近或者是质量数呈规律性变化(如 +H、+Na、-H 等),提出“它们为同一物质的不同碎片”的假设,基于 Metlab 进行了各峰的相关性检验,相关系数 ≥ 0.95 的峰视为同一物质。这样可以更好的对这些质核比和保留时间相近的内源性标志物进行解释,这也是本实验数据处理中的一个亮点。前期研究表明该法具有较好的准确度和可重复性。(2) 本研究采用 PCA、PLS-DA 对数据进行降维分析,在简化了数据分析的同时,可能会丢失一部分在样本中丰度较低的代谢产物的信息,因此,对于 loading plot 中排名靠后(对差异产生的贡献较小,可能由低丰度引起)的代谢标志物也进行了数据库检索和分析鉴定,尽量减少由于数据分析方法造成的误差。

本研究结果表明,大黄通过减少 CRF 大鼠血液中儿茶酚胺类物质生成,减少磷酸酯类物质分解,减少炎症介质产生,使体内 *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢和蛋氨酸循环恢复正常而发挥其 CRF 治疗作用。

参考文献

- [1] Meguid E N A, Bello A K. Chronic kidney disease: the global challenge [J]. *Lancet*, 2005, 365(68): 331-340.
- [2] 庄露凝, 谷元, 刘昌孝, 等. 药动学-药效学模型在新药评价中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 161-166.
- [3] 童延清. 酒大黄延缓慢性肾功能衰竭的远期疗效观察 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2002, 9(6): 49-50.
- [4] 张燕平. 大黄治疗慢性肾功能衰竭的研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(10): 638-640.
- [5] 林华. 大黄防治多器官功能衰竭综合征疗效观察 [J]. *现代医药卫生*, 2005, 21(8): 990-991.
- [6] 傅晓晴, 武一, 陈振彬, 等. 腺嘌呤制作肾阳虚型慢性肾功能衰竭大鼠模型的电镜病理学研究 [J]. *福建中医学院学报*, 2002, 12(3): 41-43.
- [7] Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, et al. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- [8] Rezzi S, Ramadan Z, Francois-Pierre J, et al. Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(11): 4469-4477.
- [9] Rezzi S, Ramadan Z, Laurent B, et al. Nutritional metabonomics: applications and perspectives [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 513-525.
- [10] 李春雨, 孟宪丽, 沈晓飞. 大黄治疗慢性肾功能衰竭的实验研究 [A]. 第九届四川生理科学会学术交流会议论文集 [C]. 成都: 四川省科学技术协会, 2009.
- [11] 郑兴宇, 高晓霞, 刘晓节, 等. 基于代谢组学技术应激动物模型的评价 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 175-179.
- [12] 吴久利. 两种氨基酸和三种遗传病 [J]. *生物学教学*, 2005, 30(10): 72-74.
- [13] 苏静怡. 病理生理学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991.
- [14] 江正辉. 临床水、电解质及酸碱平衡 [M]. 重庆: 重庆出版社, 1992.