

基于 UPLC-Q-Exactive-MS 代谢组学技术的蒙药塔布森-2 对去势大鼠代谢的调控作用研究

杨帆^{1,2}, 冯文斌¹, 董馨¹, 马飞祥¹, 陆景坤¹, 薛培凤^{1*}

1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

2. 呼伦贝尔市中蒙医院 药剂科, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

摘要: 目的 基于超高效液相色谱联用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (UPLC-Q-Exactive-MS) 代谢组学技术, 研究蒙药塔布森-2 (由杜仲和蓝刺头配伍而成) 对去势大鼠代谢的调控作用。方法 Wistar 雌性大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、结合雌激素组 (0.065 mg/kg)、骨疏康颗粒组 (105.1 mg/kg) 和蒙药塔布森-2 高、中、低剂量 (950、475、237.5 mg/kg) 组, 每组 6 只。大鼠进行卵巢摘除术后 1 周, 进行阴道上皮细胞角质化实验, 检测造模成功后, 各给药组 ig 相应药物, 空白组、假手术组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 持续 8 周。末次给药 24 h 后, 采集各组大鼠的粪便尿液, 进行 UPLC-Q-Exactive-MS 检测。结果 尿液样本中, 共鉴定出 28 个潜在生物标志物及 8 条代谢通路与蒙药塔布森-2 治疗绝经后骨质疏松症有关; 粪便样本中, 共鉴定出 28 个潜在生物标志物及 7 条代谢通路与蒙药塔布森-2 治疗绝经后骨质疏松症有关。结论 蒙药塔布森-2 主要通过调节组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、丙氨酸及天冬氨酸和谷氨酸代谢、维生素 B₆ 代谢, 治疗绝经后骨质疏松症。

关键词: 蒙药塔布森-2; 绝经后骨质疏松; UPLC-Q-Exactive-MS; 代谢组学; 去势大鼠; 维生素 B₆; L-天冬氨酸; 牛磺酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)19-5939-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.017

Effect of Tubson-2 on metabolism in ovariectomized rats based on UPLC-Q-Exactive-MS metabolomics

YANG Fan^{1,2}, FENG Wen-bin¹, DONG Xin¹, MA Fei-xiang¹, LU Jing-kun¹, XUE Pei-feng¹

1. Department of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

2. Department of Pharmacy, China Mongolia Hospital of Hulun Buir, Hulun Buir 021000, China

Abstract: Objective To explore the effect of Mongolian medicine Tubson-2 (塔布森-2, combined with *Eucommia ulmoides* and *Echinops grijsii*) on metabolism in ovariectomized rats based on UPLC-Q-Exactive-MS metabolomics technology. **Methods** Female Wistar rats were randomly divided into blank group, sham group, model group, conjugated estrogen group (0.065 mg/kg), Gushukang Granule group (105.1 mg/kg), high-, medium- and low-dose Mongolian medicine Tubson -2 (950, 475, 237.5 mg/kg) groups, with six animals in each group. One week after ovarian extraction, rats were subjected to vaginal epithelial cell keratinization experiments. After successful modeling, rats in each administration group were ig corresponding drugs, rats in blank group, sham group and model group were ig 0.9% sodium chloride solution, once a day for 8 weeks. 24 h after the last administration, feces and urine of rats in each group were collected for UPLC-Q-Exactive-MS detection. **Results** A total of 28 potential biomarkers and eight metabolic pathways were identified in urine samples related to the treatment of postmenopausal osteoporosis by Mongolian medicine Tubson-2; A total of 28 potential biomarkers and seven metabolic pathways were identified in feces samples related to the treatment of postmenopausal osteoporosis by Mongolian medicine Tubson-2. **Conclusion** Mongolian medicine Tubson-2 mainly regulates histidine metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, alanine, aspartic acid and glutamate metabolism and vitamin B₆ metabolism to treat postmenopausal osteoporosis.

收稿日期: 2021-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860756); 国家自然科学基金资助项目 (81960758); 内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目 (02039001); 内蒙古医科大学整合药理学蒙药药效物质基础研究团队专项 (NYTD-2018001)

作者简介: 杨帆, 硕士研究生, 从事中蒙药药效物质基础及质量控制研究。Tel: (0471)6653146 E-mail: yf15548832423@163.com

*通信作者: 薛培凤, 教授, 从事中蒙药药效物质基础及质量控制研究。Tel: (0471)6653146 E-mail: Xpfdc153@163.com

Key words: Tubson-2; menopausal osteoporosis; UPLC-Q-Exactive-MS; metabolomics; ovariectomized rats; vitamin B6; L-aspartic acid; taurine

蒙药塔布森-2 又称二味杜仲汤, 由杜仲与蒙药蓝刺头配伍而成, 记载于经典的蒙医医学著作《蒙医金匱》, 是蒙医治疗骨伤的常用方剂, 可固骨质、接骨愈伤、清赫依, 用于治疗骨折、骨热、赫依症等。应用蒙药二味杜仲汤临床治疗 60 例绝经后骨质疏松症患者, 总体治愈率达到 90%^[1]。蒙药二味杜仲汤可通过类雌激素样作用抑制骨吸收, 促进骨形成, 调节骨吸收与骨形成的耦联, 降低骨转换率, 减少骨丢失, 延缓绝经后骨质疏松症的发生发展过程^[2]。

本课题组前期对蒙药塔布森-2 进行了提取工艺、体内药理学、网络药理学、药动学、血清药物化学及血清代谢组学研究^[3-4], 发现蒙药塔布森-2 能够明显改善去势大鼠骨密度、骨体积/总体积、骨小梁数量、骨小梁分离度等骨微结构参数。采用网络药理学预测了蒙药塔布森-2 与绝经后骨质疏松密切相关的 3 个创新性靶点并在血清中进行了机制验证, 结果表明蒙药塔布森-2 能够降低血清中维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR)、细胞色素 P450 19A1 (cytochrome p450 19A1, CYP19A1) 含量从而发挥抗绝经后骨质疏松的作用。但是仅仅通过药效学、药动学和血清药物化学的研究单一且分散, 不能很好地反映蒙药治疗疾病的整体观。而网络药理学虽然具有“多成分、多目标”的整体观念, 但只能起到预测的作用。

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学后兴起的系统生物学分支, 被认为是最新的“组学”科学, 可以对来自组织、细胞或生物体液的小分子代谢产物进行全面、系统地分析^[5]。代谢物的组成和浓度可能随着疾病的进展而改变, 代谢组学有助于筛选与疾病密切相关的潜在生物标志物或靶向治疗途径的基因^[6]。因此, 本研究从尿液粪便样品入手, 采用超高效液相色谱联用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Exactive-MS) 代谢组学技术研究蒙药塔布森-2 对去势大鼠代谢的调控作用, 以期更加全面地阐述蒙药塔布森-2 治疗绝经后骨质疏松的代谢通路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雌性大鼠 48 只, 12 周龄, 体质

量 (220±20) g, 购自内蒙古医科大学实验动物研究中心, 动物许可证号 SCXK (蒙) 2015-0001。动物于温度 20~23 ℃、相对湿度 50%~60%、12 h 昼夜交替的环境中适应性饲养 7 d, 自由进食饮水。动物实验经内蒙古医科大学医学伦理委员会批准 (批准号 YKD2018056)。

1.2 药材

蒙药蓝刺头药材于 2019 年 8 月采自内蒙古呼和浩特市武川县, 杜仲药材 (批号 112987) 购自安徽亳州市大禹药业有限公司, 经内蒙古医科大学药学院薛培凤教授鉴定分别为菊科植物驴欺口 *Echinops latifolius* Tausch 的干燥花序、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。

1.3 药品与试剂

结合性雌激素片 (批号 20170102, 每片含结合雌激素 0.625 mg) 购自新疆新姿源生物制药公司生产; 骨疏康颗粒 (批号 180108073, 10 g/袋) 购自辽宁康辰药业; 水合氯醛 (批号 RH122661) 购自罗恩试剂; 质谱级甲酸、甲醇购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 超纯水经 ALH-600-U 净化系统制备。

1.4 仪器

UPLC-Q-Exactive-MS (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BA210 型数码显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); EYELAN-1100 型旋转蒸发器 (上海爱郎仪器有限公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); 离心机 (德国 CHRIST 公司); BCD-290W 型电冰箱 (青岛海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 蒙药塔布森-2 药液的制备

根据本课题组前期确定的蒙药塔布森-2 的最佳提取工艺进行药液制备, 具体操作如下: 将方中蓝刺头与杜仲粉碎后过筛制得粗粉, 各取 250 g, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 连续加热回流提取 2 次, 30 min/次。合并滤液, 减压浓缩, 冷冻干燥, 冻干粉末于 4 ℃ 保存, 使用时用适量蒸馏水溶解。该法平均得粉率为 25%, 蒙药塔布森-2 药液含有效成分京尼平苷酸 0.100 mg/g、新绿原酸 0.086 mg/g、绿原酸 0.587 mg/g、京尼平苷 0.021 mg/g、松脂醇二葡萄糖苷 0.140 mg/g、异绿原酸 A 0.116 mg/g、1,5-O-

二咖啡酰基奎宁酸 0.070 mg/g、异绿原酸 C 0.042 mg/g、紫云英苷 0.025 mg/g。

2.2 造模、分组与给药

大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、结合雌激素组 (0.065 mg/kg)、骨疏康颗粒组 (105.1 mg/kg) 和蒙药塔布森-2 高、中、低剂量 (950.0、475.0、237.5 mg/kg, 分别相当于临床 4、2、1 倍剂量) 组, 每组 6 只。除空白组外, 其余各组均进行卵巢摘除术, 假手术组只摘除相应位置的部分脂肪团。术后连续 3 d 大鼠 im 青霉素钠, 防止术后感染。手术 7 d 后, 取空白组和模型组大鼠进行阴道上皮角化实验, 每日涂片 1 次, 连续观察 5 d, 细胞的形

态及染色情况见图 1, 空白组大鼠表现为动情周期交替出现, 模型组大鼠连续 5 d 均表现为发情间期, 提示造模成功^[7]。蒙药塔布森-2 冻干粉溶于 0.9% 氯化钠溶液, 分别配制成质量浓度为 29.69、59.38、118.75 mg/mL 的溶液; 骨疏康颗粒溶于 0.9% 氯化钠溶液, 分别配制成质量浓度为 13.14 mg/mL 的溶液; 结合雌激素片溶于 0.9% 氯化钠溶液, 分别配制成质量浓度为 8.13 mg/mL 的溶液。手术 7 d 后, 各给药组 ig 相应药物, 空白组、假手术组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 8 周。大鼠末次给药后, 进入代谢笼饲养, 期间禁食不禁水, 24 h 后收集尿液和粪便, 迅速分装后于 -80 °C 保存备用。

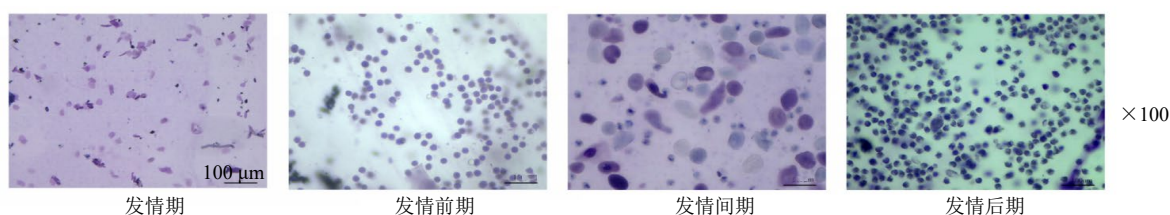


图 1 显微镜下大鼠动情周期阴道涂片

Fig. 1 Rat estrus cycle vaginal smear under microscope

2.3 UPLC-Q-Exactive-MS 代谢组学分析

2.3.1 尿液、粪便样本的处理 取出冻存尿液, 自然解冻, 每个尿液样本取 200 μ L, 分别置于干燥的离心管中, 加入 3 倍量甲醇涡旋 3 min, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。取出冻存粪便, 自然解冻, 每个粪便样本取 50 mg, 加入 3 倍量甲醇进行研磨, 涡旋 5 min, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。将所有的上清液于 35 °C 减压干燥后加入 200 μ L 甲醇复溶, 涡旋 3 min, 离心, 取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 转移至自动进样瓶, 进行 UPLC-Q-Exactive-MS 分析。

2.3.2 质控样本的处理 将所有待测尿液或粪便样本按“2.3.1”项下方法处理, 得到上清液, 各取 20 μ L, 混合成粪便或尿液质控样本, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 转移至自动进样瓶, 进行 UPLC-Q-Exactive-MS 分析。进样时, 每走完 1 组样本, 插入 1 针质控样本。

2.3.3 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~1.7 min, 5%~15% A; 1.7~3.0 min, 15%~17% A; 3.0~3.3 min, 17% A; 3.3~8.0 min, 17%~25% A; 8.0~9.7 min, 25%~30% A; 9.7~10.6 min, 30%~35% A; 10.6~

14.1 min, 35%~55% A; 14.1~4.6 min, 55% A; 14.6~15.1 min, 55%~100% A; 15.1~17.0 min, 100% A; 17.0~18.1 min, 100%~5% A; 18.1~20 min, 5% A; 柱温为 35 °C; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 5 μ L。

2.3.4 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式下离子源电压为 4 kV, 鞘气体积流量为 40 L/min; 负离子模式下离子源电压为 3.2 kV, 鞘气体积流量为 35 L/min; 离子源温度为 350 °C; 饱和辅助气体积流量为 2 L/min; 裂解电压为 300 V; 雾化气为氮气; 数据采集范围 m/z 100~1100, 采用全扫描方式。

2.3.5 多元数据分析及数据处理 原始数据文件通过 Discoverer Compound (CD) TM 2.0 软件, 进行峰对齐、峰过滤、峰提取和自动积分, 最终创建了 1 个包含相对分子质量、保留时间 (t_R)、峰面积、 $mzCloud$ 等信息的多维峰表。利用 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以识别每组样品的总体代谢谱。通过正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 对蒙药塔布森-2 中剂量组和模型组的数据进行统计分析, 用于降低所获得的多维复杂数据的维度, 绘制出反映组间离散程度的得分图。

筛选出变量重要性投影值 (VIP, variable importance plot) >1 且 $P<0.05$ 的离子作为潜在的特征性生物标志物, 将潜在的生物标志物与人类代谢组数据库 (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>) 和 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) 进行生物标志物的名称和 HMDB 编号等信息的匹配。再利用 MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 分析参与代谢的生物通路和意义。

3 结果

3.1 潜在生物标志物的筛选

3.1.1 尿液样本中潜在生物标志物的筛选 各组大鼠尿液的 PCA 得分图见图 2, 在正负离子模式下, 质控样品分布集中, 显示出良好的重现性和可靠性; 模型组与其他组的数据得到了良好区分, 空白组和模型组大鼠样品距离较远, 表明建模成功; 空白组数据有一些离散, 可能是由大鼠的个体差异和进样的时间差异导致的。OPLS-DA 是基于偏最小二乘法的降噪方法, 可以消除与变量相关的正交成分, 提

高模型的准确度和有效性, 很好地揭示组间差异, 排除潜在混淆的影响与组差异无关的变量^[8]。为了进一步探索蒙药塔布森-2 治疗绝经后骨质疏松的尿液潜在生物标志物, 将蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组进行 OPLS-DA 分析, 见图 3。采用 200 次置换检验的方法对模型进行验证, 具体拟合参数结果见表 1, 正离子模式下: 模型解释率 (R^2_Y) = 0.998, 模型预测率 (Q^2) = 0.934; 负离子模式下: R^2_Y = 0.995, Q^2 = 0.896, 表明模型未过拟合, 具有很好的预测能力及可靠性。模型组与蒙药塔布森-2 中剂量组样本具有很好的区分。结合 VIP-plot 分析结果, 筛选 VIP >1 且 $P<0.05$ 的离子作为差异性代谢物, 最终筛选得到 28 个潜在差异生物标志物见表 2, 其中正离子 15 个、负离子 13 个。

3.1.2 粪便样本中潜在生物标志物的筛选 各组大鼠的粪便代谢轮廓 PCA 得分图见图 4, 在正负离子模式下, 质控样品均显示出良好的集中趋势, 表明本次实验的可靠性。为了筛选粪便样本中蒙药塔布

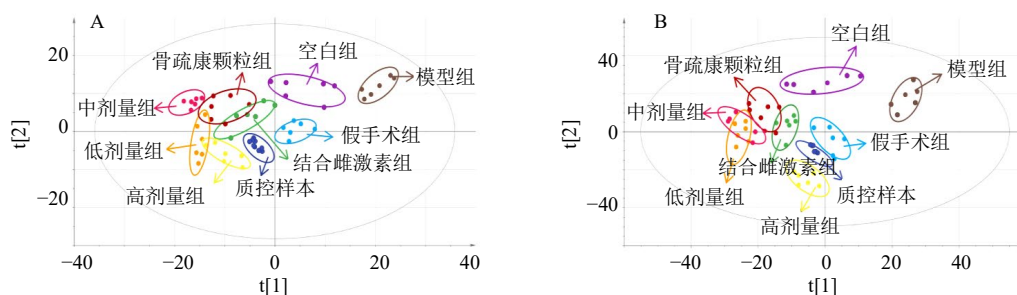


图 2 正离子 (A) 和负离子 (B) 下各组大鼠尿液样本的 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plot of urine samples of rats in each group in positive ion (A) and negative ion (B)

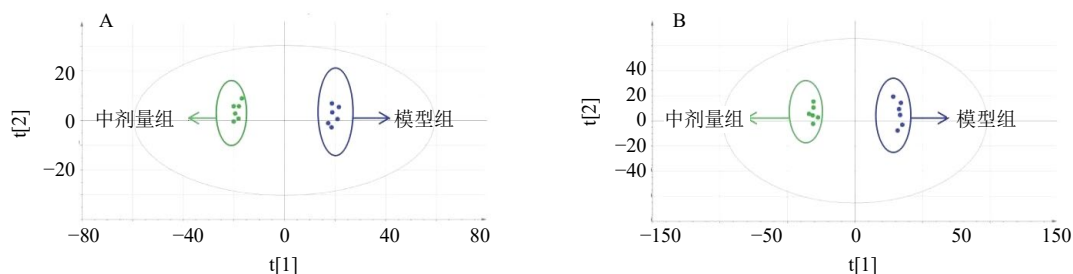


图 3 正离子 (A) 和负离子 (B) 下蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠尿液样本的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot of urine samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group in positive ion (A) and negative ion (B)

表 1 200 次置换检验后蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠尿液样本的 OPLS-DA 模型拟合参数

Table 1 OPLS-DA model parameters of urine samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group by 200 permutation tests

离子模式	A	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2 截距	Q^2 截距
正离子	1+1+0	0.416	0.998	0.934	0.835	-0.101
负离子	1+1+0	0.416	0.995	0.896	0.876	-0.136

表 2 蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠尿液样本的潜在差异代谢物

Table 2 Potential different metabolites in urine samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group

编号	代谢物	分子式	离子模式	m/z		误差/ ($\times 10^{-6}$)	t_R/min	VIP	模型组 vs 假手术组	蒙药塔布森-2 中 剂量组 vs 模型组
				测定值	预测值					
1	3-羟基丁酸	C ₄ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	103.040 1	104.046 2	-9.76	1.28	1.66	↑	↓
2	N-丁甘氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	156.066 6	157.073 2	-6.45	3.59	1.64	↑	↓
3	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 5	270.053 7	-3.75	17.68	1.59	↓	↑
4	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	[M-H] ⁻	178.051 0	179.057 6	-5.65	4.74	1.58	↑	↓
5	葡萄糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	195.051 0	196.057 9	-5.16	0.71	1.57	↑	↓
6	3-羟基十二酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	[M-H] ⁻	187.134 0	188.140 9	-5.38	17.69	1.57	↓	↑
7	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.019 7	192.026 4	-5.27	0.82	1.43	↑	↓
8	L-组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M-H] ⁻	154.062 2	155.068 8	-6.53	0.63	1.41	↑	↓
9	N-乙酰-L-天冬氨酸	C ₆ H ₉ NO ₅	[M-H] ⁻	174.040 8	175.047 5	-5.78	0.72	1.40	↑	↓
10	肉桂基甘氨酸	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	204.066 6	205.073 6	-4.93	10.96	1.38	↑	↓
11	L-天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	[M-H] ⁻	132.644 8	133.037 6	-2.96	0.76	1.32	↑	↓
12	邻乙酰丝氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	146.045 9	147.052 2	-6.89	0.85	1.26	↑	↓
13	5-羟基吡啶-3-乙酸	C ₁₀ H ₉ NO ₃	[M-H] ⁻	190.051 0	191.057 9	-5.30	7.03	1.23	↑	↓
14	3-异丙基苹果酸	C ₇ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	175.061 2	176.067 9	-5.75	0.70	1.20	↓	↑
15	吡啶-3-乳酸	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	204.066 6	205.073 8	-4.94	9.50	1.20	↑	↓
16	N-苯基乙酰谷氨酰胺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	265.118 3	264.109 7	3.80	5.49	1.83	↑	↓
17	3,3-二甲基戊二酸	C ₇ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	161.080 8	160.071 6	6.27	4.89	1.66	↓	↑
18	半乳糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	197.065 6	196.056 4	5.12	0.73	1.63	↑	↓
19	L-苏糖酸	C ₄ H ₈ O ₅	[M+H] ⁺	137.044 4	136.035 3	7.36	0.89	1.54	↑	↓
20	牛磺酸	C ₂ H ₇ NO ₃ S	[M+H] ⁺	126.021 9	125.012 7	8.01	0.78	1.53	↑	↓
21	3-羟基邻氨基苯甲酸	C ₇ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	154.049 9	153.040 8	6.55	0.94	1.35	↓	↑
22	喹啉酸	C ₇ H ₅ NO ₄	[M+H] ⁺	168.029 1	167.023 4	5.99	1.11	1.27	↑	↓
23	庚二酸	C ₇ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	161.080 8	160.071 7	6.26	6.23	1.25	↑	↓
24	3-羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	139.039 0	138.029 8	7.25	11.04	1.25	↓	↑
25	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	[M+H] ⁺	169.035 6	168.026 5	5.97	1.07	1.19	↑	↓
26	2-羟基马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	196.060 4	195.051 6	5.15	3.31	1.16	↑	↓
27	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	193.070 7	192.061 6	5.23	0.85	1.13	↓	↑
28	尿刊酸	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	139.050 2	138.041 1	7.26	0.98	1.03	↓	↑

↓表示下调, ↑表示上调, 表 4 同

↓ shows down-regulated, ↑ shows up-regulated, same as Table 4

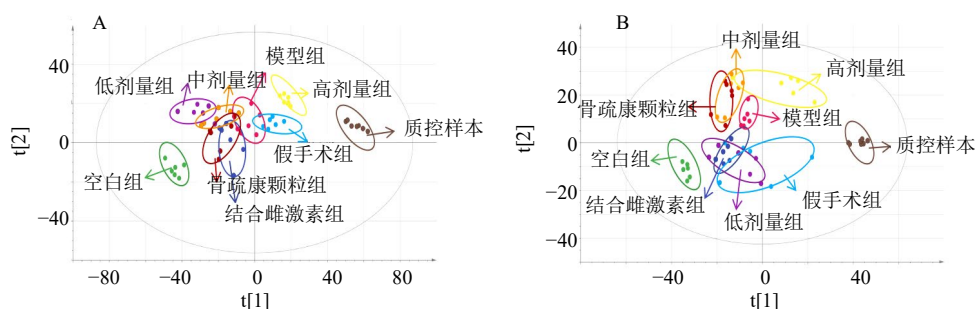


图 4 正离子 (A) 和负离子 (B) 下各组大鼠粪便样本的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of feces samples of rats in each group in positive ion (A) and negative ion (B)

森-2 治疗绝经后骨质疏松的潜在生物标志物, 进一步采用有监督的 OPLS-DA, 可以更好地获取组间差异信息, 并对样品的分组进行预测, 结果见图 5。采用 200 次响应排列测试对模型的质量进行研究, 模型未过拟合, 具有很好的预测能力及可靠性, 具

体拟合参数见表 3, 表明模型组与蒙药塔布森-2 中剂量组样本得到了良好的区分。结合 VIP-plot 分析结果, 筛选 VIP>1 且 $P<0.05$ 的离子作为差异性代谢物, 最终筛选得到 28 个潜在生物标志物见表 4, 其中正离子 19 个、负离子 9 个。

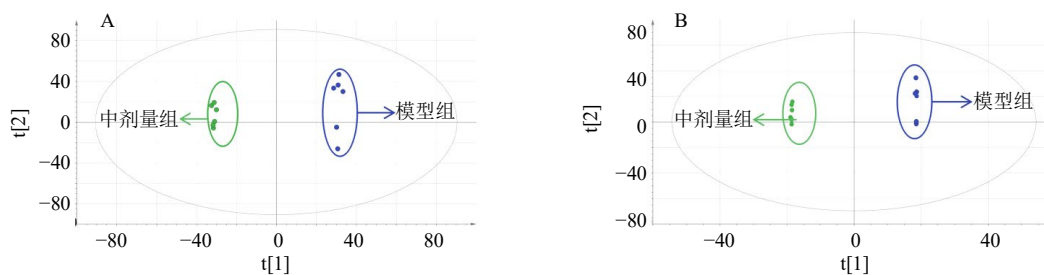


图 5 正离子 (A) 和负离子 (B) 下蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠粪便样本的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot of feces samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group in positive ion (A) and negative ion (B)

表 3 200 次置换检验后蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠粪便样本的 OPLS-DA 模型拟合参数

Table 3 OPLS-DA model parameters of feces samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group by 200 permutation tests

离子模式	A	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2 截距	Q^2 截距
正离子	1+1+0	0.282	0.967	0.692	0.926	-0.139
负离子	1+1+0	0.288	0.953	0.490	0.919	-0.080

表 4 蒙药塔布森-2 中剂量组与模型组大鼠粪便样本的潜在差异代谢物

Table 4 Potential different metabolites in feces samples of rats in medium-dose Mongolian medicine Tubson-2 group and model group

编号	代谢物	分子式	离子模式	相对分子质量 测定值 预测值	误差/ ($\times 10^{-6}$)	t_R / min	VIP	模型组 vs 假手术组	蒙药塔布森-2 中 剂量组 vs 模型组
1	2'-脱氧肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	[M+H] ⁺	253.093 1 252.085 0	1.57	1.34	1.88	↓	↑
2	L-谷氨酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	147.076 4 146.069 3	6.85	0.98	1.70	↓	↑
3	5-氨基戊烷酰胺	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	117.102 2 116.095 2	8.60	0.86	1.63	↑	↓
4	6-羟基褪黑素	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	249.123 4 248.115 3	4.05	11.94	1.56	↑	↓
5	L-天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	[M+H] ⁺	134.044 8 133.037 6	7.51	0.94	1.47	↑	↓
6	3-吡啶乙酸	C ₇ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	138.055 0 137.047 6	7.30	1.05	1.44	↑	↓
7	L-天冬酰胺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	133.060 8 132.053 6	7.69	0.90	1.37	↑	↓
8	L-组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	156.076 8 155.069 6	6.45	0.80	1.36	↓	↑
9	4-(2-氨基苯基)-2,4-二氧丁酸酯	C ₁₀ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	208.060 4 207.053 1	4.84	1.12	1.33	↑	↓
10	吡啶-3-乙酸	C ₁₀ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	176.070 6 175.063 3	5.72	11.63	1.30	↑	↓
11	L-天门冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	[M+H] ⁺	134.044 8 133.037 6	7.51	1.04	1.21	↑	↓
12	L-谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	148.060 4 147.053 1	6.80	0.89	1.19	↑	↓
13	L-蛋氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	[M+H] ⁺	150.058 3 149.050 6	6.72	1.42	1.19	↓	↑
14	L-精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175.119 0 174.111 6	5.75	1.77	1.18	↑	↓
15	吡哆醛	C ₈ H ₉ NO ₃	[M+H] ⁺	168.065 5 167.058 2	5.99	1.11	1.15	↓	↑
16	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 2 194.057 8	5.16	10.65	1.13	↑	↓
17	吡哆醇	C ₈ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	170.081 2 169.074 0	5.92	0.97	1.10	↑	↓
18	吡哆氨 5'-磷酸盐	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₅ P	[M+H] ⁺	249.0635 248.056 5	4.04	6.29	1.07	↑	↓
19	吡哆胺	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	169.097 2 168.089 8	5.96	1.78	1.05	↑	↓
20	3-羟基蒽醌	C ₇ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻	152.035 3 153.041 7	-6.62	1.62	1.99	↓	↑
21	茉莉酸	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	[M-H] ⁻	209.118 3 210.125 3	-4.82	16.09	1.85	↓	↑
22	4-羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	121.029 5 122.035 7	-8.31	5.30	1.68	↑	↓
23	谷氨酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	145.061 9 146.068 2	-6.94	0.62	1.57	↓	↑
24	牛磺酸	C ₂ H ₇ NO ₃ S	[M-H] ⁻	124.007 4 125.013 6	-8.11	0.63	1.56	↑	↓
25	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 5 270.053 5	-3.75	16.84	1.54	↑	↓
26	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	[M-H] ⁻	178.051 0 179.057 6	-5.65	4.75	1.28	↑	↓
27	N-乙酰-L-苯基丙氨酸	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	[M-H] ⁻	206.082 3 207.089 2	-4.89	8.98	1.23	↑	↓
28	4-吡哆酸	C ₈ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	182.045 9 183.052 5	-5.53	0.96	1.12	↑	↓

3.2 代谢通路分析

3.2.1 尿液样本中潜在生物标志物的代谢通路分析 为了进一步探索蒙药塔布森-2 调节去势大鼠尿液潜在生物标志物的代谢通路，将上述分析得到的 28 个差异性代谢物导入 MetaboAnalyst 数据库对鉴定出的差异代谢生物标志物进行代谢通路的富集，将通路影响值 >0.1 的代谢通路作为目标代谢通路。如图 6 和表 5 所示，蒙药塔布森-2 主要通过参与组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸的代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 3 个代谢通路来治疗去势大鼠的绝经后骨质疏松症。

3.2.2 粪便样本中潜在生物标志物的代谢通路分析 为了进一步探索蒙药塔布森-2 调节去势大鼠粪便潜在生物标志物的代谢通路，将上述分析得到的 28 个差异性代谢物导入 MetaboAnalyst 数据库进

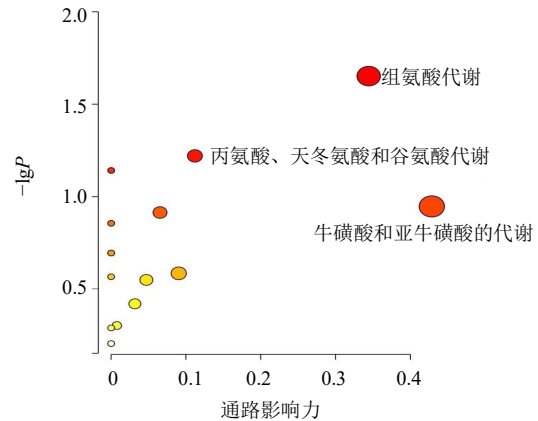


图 6 蒙药塔布森-2 调节去势大鼠尿液潜在生物标志物的代谢通路

Fig. 6 Metabolic pathway of Mongolian medicine Tubson-2 regulated potential biomarkers in urine of ovariectomized rats

表 5 蒙药塔布森-2 调节去势大鼠尿液潜在生物标志物的代谢通路分析

Table 5 Metabolic pathways analysis of Tubson-2 regulated potential biomarkers in urine of ovariectomized rats

代谢通路	化合物总数/个	匹配数/个	原始 P 值	通路影响值	匹配化合物
牛磺酸和亚牛磺酸的代谢	8	1	0.112 97	0.428 57	牛磺酸
组氨酸代谢	16	2	0.022 28	0.344 26	尿刊酸、L-组氨酸
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	28	2	0.063 03	0.108 65	N-乙酰-L-天冬氨酸、L-天冬氨酸
色氨酸代谢	41	2	0.121 84	0.065 47	5-羟基吡啶-3-己酸、3-羟基邻氨基苯甲酸
磷酸戊糖途径	22	1	0.281 91	0.047 12	葡萄糖酸
乙醛酸和二羧酸的代谢	32	1	0.383 25	0.031 75	柠檬酸
三羧酸循环	20	1	0.259 82	0.009 03	柠檬酸
初级胆汁酸的生物合成	46	1	0.502 40	0.007 58	牛磺酸

行代谢通路富集，将通路影响值 >0.1 的代谢通路作为目标代谢通路。如图 7 和表 6 所示，蒙药塔布森-2 主要通过参与维生素 B₆ 代谢、丙氨酸，天冬氨酸和谷氨酸代谢、谷氨酰胺和谷氨酸代谢 3 个代谢通路来治疗去势大鼠的绝经后骨质疏松症。

4 讨论

骨质疏松症是一种由多种原因引起的代谢性骨疾病，随着世界老龄化进程的加速，骨质疏松症的发病率已跃居慢性病第 3 位。我国骨质疏松症的总患病率平均为 13%^[9]。其中最常见的类型为绝经后骨质疏松症，它是一种由雌激素缺少而导致的骨量低下、骨质量受损及骨强度降低的原发性 I 型骨质疏松疾病。目前雌激素替代疗法仍然为治疗绝经型骨质疏松症的“黄金手段”，但是长期采用此疗法会诱发卵巢疼痛和浸润性乳腺癌^[10]。因此寻找安全可靠的抗绝经后骨质疏松药物意义重大。

通过对大鼠的尿液样品、粪便样品的代谢组学

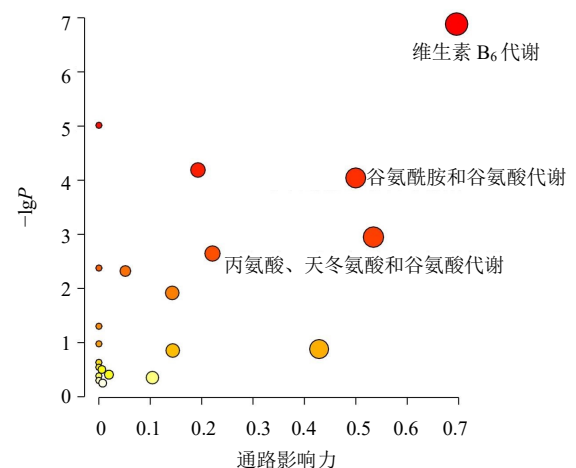


图 7 蒙药塔布森-2 调节去势大鼠粪便潜在生物标志物的代谢通路

Fig. 7 Metabolic pathway of Mongolian medicine Tubson-2 regulated potential biomarkers in feces of ovariectomized rats

表 6 蒙药塔布森-2 调节去势大鼠粪便潜在生物标志物的代谢通路分析

Table 6 Metabolic pathways analysis of Mongolian medicine Tubson-2 regulated potential biomarkers in feces of ovariectomized rats

代谢通路	化合物 总数/个	匹配数/ 个	原始 <i>P</i> 值	通路影响值	匹配化合物
维生素 B ₆ 代谢	9	5	1.31×10^{-7}	0.696 1	吡哆氨 5'-磷酸盐、吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺、4-吡哆酸
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	28	4	1.13×10^{-3}	0.534 5	<i>L</i> -天冬氨酸、 <i>L</i> -天冬酰胺、 <i>L</i> -谷氨酰胺、 <i>L</i> -谷氨酸
谷氨酰胺和谷氨酸代谢	6	2	9.12×10^{-5}	0.500 0	<i>L</i> -谷氨酰胺、 <i>L</i> -谷氨酸
牛磺酸和亚牛磺酸的代谢	8	1	0.131	0.428 6	牛磺酸
组氨酸代谢	16	3	2.27×10^{-3}	0.221 3	<i>L</i> -组氨酸、 <i>L</i> -谷氨酸、 <i>L</i> -天冬氨酸
精氨酸生物合成	14	4	6.51×10^{-5}	0.192 9	谷氨酸、 <i>L</i> -精氨酸、 <i>L</i> -天冬氨酸、 <i>L</i> -谷氨酰胺
精氨酸和脯氨酸代谢	38	2	0.140	0.143 9	<i>L</i> -精氨酸、 <i>L</i> -谷氨酸

分析可知,蒙药塔布森-2 治疗绝经后骨质疏松症与多条代谢通路的紊乱相关,包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢及牛磺酸和亚牛磺酸的代谢、组氨酸代谢和维生素 B₆ 代谢。其中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢为尿液、粪便样本中共同存在的代谢通路。天冬氨酸是一种兴奋性神经递质,参与机体内多种代谢过程,通常情况下,机体代谢发生异常均会引起丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢的紊乱。模型组大鼠尿液、粪便样本中天冬氨酸水平均有所升高,而蒙药塔布森-2 能够显著回调天冬氨酸水平,其发生机制和变化的意义尚缺乏文献报道,需要进一步研究。

组氨酸代谢主要通过下调组氨酸及上调尿刊酸水平来干扰组氨酸代谢的紊乱,进而控制去势大鼠的骨质疏松进程,达到治疗绝经后骨质疏松症的作用。组氨酸脱羧基生成组氨,组氨可以间接增加破骨细胞的数量和活性,进而导致骨质疏松症和异常骨组织形态学指标的发生^[11],组氨酸的水平降低能够抑制破骨细胞活性,降低骨质疏松症的发生率。本研究结果显示,经蒙药塔布森-2 治疗后大鼠尿液中组氨酸水平下降,尿刊酸水平上升,进而减轻绝经后骨质疏松的程度。尿刊酸是由 *L*-组氨酸通过组氨酸解氨酶脱氨而来,是组氨酸的下游产物^[12]。蒙医理论认为,骨病的治疗原则与赫依盛型肾病相吻合,因此推测尿刊酸可能通过影响肾功能进而影响骨代谢。牛磺酸是牛磺酸与亚牛磺酸代谢通路的关键代谢物,具有抗氧化应激的作用,能够提高超氧化物歧化酶活性、降低丙二醛水平^[13]。研究表明,老年大鼠体内雌激素水平下降,导致骨组织中丙二醛水平升高,超氧化物歧化酶活性下降,进而造成骨流失^[14]。吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺是维生素 B₆ 的 3 种存在形式,而吡哆氨 5'-磷酸盐、4-吡哆酸是

维生素 B₆ 的 2 种活性存在形式,均是维生素 B₆ 代谢途径上的关键代谢产物。饮食中维生素 B₆ 的摄入量低或血液中维生素 B₆ 的含量低可能是诱导骨质疏松症的重要危险因素^[15]。蒙药塔布森-2 干预后,大鼠粪便中吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺、吡哆氨 5'-磷酸盐、4-吡哆酸的代谢量发生改变,表明蒙药塔布森-2 调节大鼠机体内的维生素 B₆ 代谢进而减轻去势大鼠的骨质疏松程度,与本课题组前期血清代谢组学研究结果一致,丰富了蒙药塔布森-2 通过调节维生素 B₆ 代谢紊乱来治疗绝经后骨质疏松症的科学内涵。

通过分析骨疏康颗粒与雌激素组对去势大鼠尿液、粪便样品的潜在生物标志物的代谢通路发现,雌激素通过调节三羧酸循环、牛磺酸和亚牛磺酸代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成和苯丙氨酸代谢来改善去势大鼠的绝经后骨质疏松程度;其中,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢及牛磺酸和亚牛磺酸代谢与蒙药塔布森-2 的代谢组学研究结果一致,均调节 *L*-天冬氨酸、牛磺酸含量,调节趋势一致,但对牛磺酸含量的调节强度较蒙药塔布森-2 稍弱。骨疏康通过调节组氨酸代谢、三羧酸循环、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、维生素 B₆ 代谢、精氨酸生物合成以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢来改善绝经后骨质疏松程度;其中,组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢及维生素 B₆ 代谢与蒙药塔布森-2 的代谢组学研究结果相同,调节趋势一致,强度相近。

综上所述,蒙药塔布森-2 主要通过调节组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、维生素 B₆ 代谢治疗绝经后骨质疏松症。此外,蒙药塔布森-2 在调节牛磺酸和亚牛磺酸代谢紊乱方面优于骨疏康颗粒与雌激素,其他通

路上的调节作用差异不大。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘晋. 蒙药二味杜仲汤治疗绝经后骨质疏松症骨痛的临床研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(8): 18-19.
- [2] 巴音额古乐, 苏毕力格图. 蒙药二味杜仲汤对骨代谢疾病及骨折愈合研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(2): 58-59.
- [3] Yang F, Dong X, Ma F X, *et al.* The interventional effects of Tubson-2 decoction on ovariectomized rats as determined by a combination of network pharmacology and metabolomics [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 581991.
- [4] Li N, Dong X, Ma F X, *et al.* Pharmacokinetics study of 16 active ingredients from Tabson-2 decoction in normal and d-galactose induced osteoporosis rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(18): 3702-3713.
- [5] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459.
- [6] Lv H, Jiang F, Guan D G, *et al.* Metabolomics and its application in the development of discovering biomarkers for osteoporosis research [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2018.
- [7] 杨海燕, 陈亚琼, 辛晓燕. 中药佳蓉片对去卵巢大鼠阴道细胞涂片的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 476.
- [8] 聂春霞, 何盼, 郝艳艳, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的山楂不同炮制品对高脂血症大鼠模型的影响研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2362-2370.
- [9] 李冲, 吕伟华, 王亭亭, 等. 1088 例医务人员骨质疏松的流行病学研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(10): 1217-1220.
- [10] Komm B S, Morgenstern D, A Yamamoto L, *et al.* The safety and tolerability profile of therapies for the prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2015, 8(6): 769-784.
- [11] Fitzpatrick L A, Buzas E, Gagne T J, *et al.* Targeted deletion of histidine decarboxylase gene in mice increases bone formation and protects against ovariectomy-induced bone loss [J]. *PNAS*, 2003, 100(10): 6027-6032.
- [12] Lovely C J, Sivappa R, Mukherjee S, *et al.* ChemInform abstract: Efficient preparation of urocanic acid derivatives from histidine [J]. *Chem Inform*, 2010, doi: 10.1002/chin.201035198.
- [13] 陈军平, 王德伟, 谭伟源, 等. GYY4137 通过提高自噬水平和降低氧化应激来保护老年雌性大鼠骨量流失 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 324-328.
- [14] 曾梦莹, 苏比努尔·巴克, 巴吐尔·买买提明, 等. 牛磺酸干预对糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(15): 1521-1525.
- [15] Wang J, Chen L, Zhang Y, *et al.* Association between serum vitamin B₆ concentration and risk of osteoporosis in the middle-aged and older people in China: A cross-sectional study [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(7): e028129.

[责任编辑 李亚楠]