



# 吴茱萸水提物给药大鼠尿液代谢组学研究

张启云<sup>1</sup>, 徐国良<sup>1</sup>, 马晓雪<sup>1</sup>, 曾治君<sup>1</sup>, 黄丽萍<sup>2</sup>, 余日跃<sup>2</sup>, 刘红宁<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330006;

2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

**[摘要]** 目的:研究吴茱萸水提液给药对大鼠内源性代谢产物的影响。方法:吴茱萸水提物按 $0.385\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给SD大鼠连续灌胃33 d,收集尿液,通过Agilent 1200 6410三重四极杆质谱对尿液中内源性代谢物进行全扫描分析,SIMCA-P软件经过PCA,PLS-DA分析。结果:给药组与对照组相比,大鼠尿液代谢物白细胞三烯,棕榈酰乙醇胺,二十二碳六烯酸,8(R)-氢过氧亚油酸/花生酸等有明显变化。结论:吴茱萸水提物灌胃对正常大鼠机体代谢产生影响,为进一步阐释吴茱萸的药性研究工作提供依据。

**[关键词]** 液质联用;代谢组学;吴茱萸;生物标记物

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth 及其变种石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 和疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinier* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,性味辛、苦、热,有小毒,有散寒止痛、降逆止呕和助阳止泻之功效,常用于治疗厥阴头痛、寒病腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻等,外治口疮,高血压<sup>[1]</sup>。近代医药学研究也证明其有镇痛、降血压、抗血栓、安神、抗菌等作用<sup>[2]</sup>。本研究尝试建立一种吴茱萸水提物对正常大鼠代谢干预的代谢组学评价方法,采用LC-MS/MS分析方法测定给药组和对照组大鼠的尿样,得到尿样中小分子代谢物的图谱,结合主成分分析(PCA)方法,考察小分子内源性代谢物受吴茱萸水提物灌胃影响而产生的变化,探讨热性药物吴茱萸水提物长期给药后,正常大鼠尿液代谢物的变化。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,雌雄各半,体重( $200\pm 20$ )g,江西中医学院动物中心提供,许可证号SCXK(赣)2006-0001。

**1.2 药物及吴茱萸水提液制备** 吴茱萸药材购自北

京鹤元堂医药科技有限公司,由本实验室制备。取吴茱萸药材6.6 kg,加入6~8倍自来水,浸泡30 min,加热至沸腾,煎煮60 min,倒出药液;残渣再加入4~6倍自来水,加热至沸腾,煎煮60 min。合并2次药液,滤过、浓缩成5 000 mL吴茱萸水提液(相当于生药 $1.32\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,HPLC测得吴茱萸碱和吴茱萸次碱分别为 $20.24,7.15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置备用。

**1.3 试剂和仪器** 乙腈(HPLC级,Product of Tedia, USA),甲酸(Sigma-Aldrich, USA),水为去离子水,SIGMA3-18K低温高速离心机(Sartorius, Germany),Agilent 1200 6410 TripleQuadrupole质谱仪(Agilent Technologies, USA),固相萃取小柱(Dikma,  $1\text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}$ )。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 12只大鼠分为给药组6只,对照组6只。大鼠分别放置于代谢笼中,自由摄食饮水,适应3 d后开始给药,每天16:00按生药 $0.385\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服1次,对照组按 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给蒸馏水,连续给药33 d。

**2.2 尿液收集和处理** 采用代谢笼,从给药前1 d开始,每天收集4 h内尿液,收集5个时间点(分别为给药前第1天,给药第8,17,26,33天),置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

尿液解冻后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $13\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取0.5 mL上清液置于分别用2 mL甲醇,2 mL纯水活化的固相萃取小柱中,先用2 mL纯水洗涤,再用1 mL甲醇洗脱,收集洗脱液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙

**[收稿日期]** 2009-01-20

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2006CB504702)

**[通信作者]** \*刘红宁, Tel: (0791) 7118857, E-mail: lhongning@yahoo.com.cn

**[作者简介]** 张启云, 讲师, 从事中药代谢与药代动力学研究

膜过滤, 备用。

**2.3 色谱条件** Agilent Zorbax Eclipse SB-C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A) 0.1% 甲酸(B), 流速 0.4 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 15 μL, 柱温 35 °C, 运行 20 min。梯度洗脱条件如表 1。

表 1 色谱梯度条件

t/min	A/%	B/%
1.75	25	75
6	60	40
8	70	30
12	90	10
14	90	10
14.1	25	75

**2.4 质谱条件** 离子源模式, ESI 正离子模式; 毛细管电压 4 000 V; 雾化器压力 275.8 kPa; 干燥气流速 10 L · min<sup>-1</sup>, 干燥气温度 350 °C, 全扫描监测得尿液总离子流图(total ion chromatogram, TIC), 提取质谱信息, 得到尿液样品所含物质的质荷比。

**2.5 数据分析** 将得到的样品数据通过 *m/z* 识别、匹配和归一化等计算过程, 得到矩阵, 将其导入 SIMCA-P 11.0 软件中进行主成分分析(PCA), 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)分析。

### 3 结果

**3.1 给药大鼠尿液总离子流图** 全扫描监测得尿液总离子流图(图 1)。反映尿液样品的化合物信息, 从中提取质谱信息, *m/z* 值及相应的丰度(A-bound)。

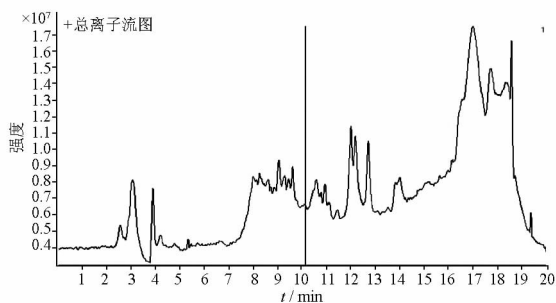
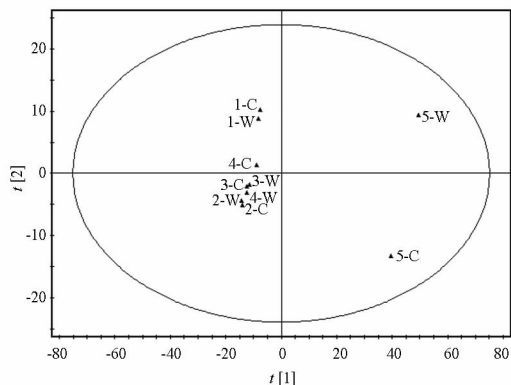


图 1 给药大鼠尿液总离子流图

**3.2 不同给药天数对大鼠尿样影响的比较** 试验进行过程中, 对照组和给药组的内源性物质都发生了变化, 其中给药第 33 天(第 5 时间点), 2 组大鼠尿液的代谢组差异最大, 说明给药第 33 天, 2 组大

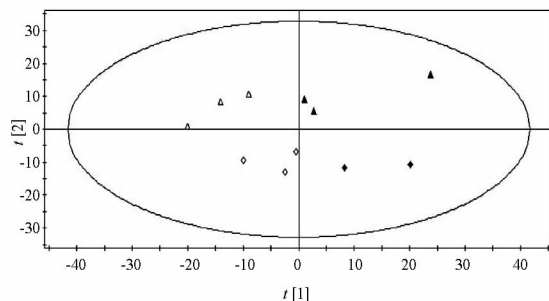
鼠尿液中内源性物质组间差异最大。因此, 对给药第 33 天的对照组与给药组数据进一步考察, 从中找出生物标记物(图 2)。



1~5.5 个样品收集时间点; C. 对照组, W. 吴茱萸组。

图 2 大鼠尿样数据均值随时间变化的 PCA 分析时间轨迹图

**3.3 给药第 33 天数据的 PCA** 采用 PCA 对给药第 33 天对照组与给药组尿液代谢物数据进行分析, 得出反映 2 组组间离散程度的各样本数据的得分图(图 3)。对图 3 进行分析可知, 2 组样本沿 *t*[1] (第一主成分) 大致分开, 因而 *t*[1] 轴方向表示组间差异, 同组雌雄在 *t*[2] 第 2 主成分维明显分开, 因而 *t*[2] 轴方向表示性别差异。说明给药第 33 天, 2 组大鼠尿液的內源性物质有明显差异, 性别差异是影响大鼠尿液代谢组的因素之一。



△ 雌性空白组; ◇ 雄性空白组; ▲ 雌性吴茱萸组;  
◆ 雄性吴茱萸组。

图 3 给药第 33 天 2 组尿液样品质谱数据的得分图

对给药第 33 天 2 组尿液样品质谱数据在 SIMCA-P 11.0 软件上得到主成分载荷图(图 4), 每个点对应的是 *m/z* 值, 以 *m/z* 值标记出在得分图中把给药组和对照组分开的生物标记物。

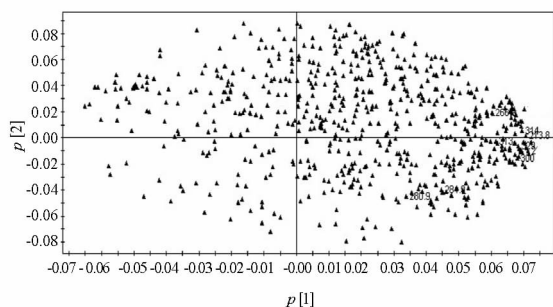


图4 给药第33天2组尿液样品质谱数据的主成分载荷图

表2 吴茱萸给药大鼠尿液的可能生物标记物及其对应信息

<i>m/z</i>	可能的化合物	化合物的生物功能	代谢物含量变化
123.8	甲基吡啶酸	色氨酸分解代谢产物	升高
	烟酸,尼克酸	重要的维生素	升高
203.9	乙酰肉(毒)碱	丙氨酸和天冬氨酸代谢成分	升高
	3-吡啶丁酸	吡啶衍生物	升高
227.1	肌肽	$\beta$ -丙氨酸和组氨酸代谢物	降低
213.8	硫酸吡啶酚	色氨酸代谢产物	升高
266.9	2,3-二磷酸甘油酸	糖分解中间产物	升高
	1,3-二磷酸甘油酸	糖分解中间产物	升高
280.9	10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -碳二烯酸	脂肪酸	升高
	9 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -碳二烯酸	脂肪酸	升高
284.9	别嘌呤核苷	核苷	升高
	黄嘌呤核苷	核苷	升高
296.9	$\alpha$ -dimorphecolic	白细胞三烯	升高
313.0	8(R)-氢过氧亚油酸	脂肪酸	升高
	花生酸	脂肪酸	升高
314.0	5'-磷酸核糖- $\alpha$ - <i>N</i> -甲酰甘氨酸	参与嘌呤代谢	升高
300.0	(神经)鞘氨醇	(神经)鞘脂类的主要成分	升高
	棕榈酰乙醇胺	具有抗炎活性	升高
329.0	二十二碳六烯酸	重要的脂肪酸	升高
	4-氧-视黄酸	视黄酸的生物活性几何异构体	升高

差异逐渐变大,给药33 d后,数据处理结果显示吴茱萸水提液给药组大鼠与蒸馏水灌胃组大鼠的内源性代谢物组差异最大,性别对代谢物组学研究也有比较明显影响。

近代医药学研究证明,吴茱萸有镇痛、降血压、抗血栓、安神、抗菌等作用<sup>[2]</sup>,本实验得到的可能生物标记物也与其药理作用相关,生物学功能明确的几种小分子化合物白细胞三烯(*m/z* 297.1),棕榈酰乙醇胺(*m/z* 300.5),二十二碳六烯酸(*m/z* 329.0),8(R)-氢过氧亚油酸/花生酸(*m/z* 313.0),2,3-二磷酸甘油酸/1,3-二磷酸甘油酸(*m/z* 266.9)。例如白细胞三烯<sup>[3]</sup>具有抗炎活性,在尿液中的含量升高,表

3.4 可能的生物标记物 显示对照组和给药组成分明显区别的是小分子物质的质荷比,可能是本研究工作中的生物标记物,由图4得出,如下123.8,203.9,227.1,213.8,266.9,280.9,284.9,296.9,313.0,314.0,300.0,329等,经网站(<http://www.hmdb.ca/>)查找,对应的化合物见表2,它们很有可能是核酸、糖类和脂类代谢内源性化合物,它们准确的结构确认需进一步研究。

#### 4 讨论

随着给药天数的增加,2组大鼠尿液的代谢组

明吴茱萸具有抗炎作用;花生酸<sup>[4]</sup>预防心血管疾病的发生,在尿液中的含量升高,表明吴茱萸具有降血压、抗血栓的作用;从能量代谢的角度分析,热性中药具有加快机体能量代谢的作用,生物标记物2,3-二磷酸甘油酸/1,3-二磷酸甘油酸<sup>[5]</sup>在尿液中的含量升高,表明吴茱萸具有加速机体能量代谢的作用。

本研究工作证明,热性中药吴茱萸水提物灌胃对正常大鼠机体代谢产生影响,为进一步确定表征热药药性的生物标记物结构提供了研究依据。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:118.
- [2] 逯振宇,蔺兴遥,崔佳.吴茱萸对心血管药理作用的研究[J].中医药研究,2002,18(2):44.



- [3] 刘焕,谢玉.白三烯与婴幼儿喘息性疾病[J].当代医学,2008,147:28. 食品科技,2004,5:57.
- [4] 姚昕,秦文,齐春梅,等.花生四烯酸的生理活性及其应用[J]. 刘庆莹,陈文为.2,3-二磷酸甘油酸代谢和生理功能[J].生理科学进展,1983,1:78.

## Preliminary study of metabonomics on aqueous extract of *Evodia rutaecarpa* in sprague-dawley rats

ZHANG Qiyun<sup>1</sup>, XU Guoliang<sup>1</sup>, WU Licun, MA Xiaoxue<sup>1</sup>, ZENG Zhijun<sup>1</sup>, HUANG Liping<sup>2</sup>, YU Riyue<sup>2</sup>, LIU Hongning<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the change of endogenous metabolites of SD rats administrated of aqueous extract of *Evodia rutaecarpa*. **Method:** Six SD rats had been successively administrated aqueous extract of *E. rutaecarpa* (0.385 7 g · kg<sup>-1</sup>) for 33 days. An agilent 1200 6410 triplequadropole mass spectrometer was used for the analysis of endogenous metabolites in rat urine samples. These data was analyzed by the principal component analysis (PCA) and PLS-DA using the SIMCA-P 10.0 software. **Result:** The significant difference in metabolic profiles between the control group and the dosed group was well observed by PCA of the MS data. **Conclusion:** The *E. rutaecarpa* has changed the endogenous metabolites of SD rats. This work can provide the base for the further research on the interpretation of drug property of *E. rutaecarpa*.

[Key words] LC-MS/MS; metabonomics; *Evodia rutaecarpa*; biomarker

doi: 10.4268/cjcm20100121

[责任编辑 古云侠]