

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.002

文章编号: 1005-8982(2016)08-0007-04

论著

决明子调脂作用的代谢组学研究*

邓楠, 余胜, 刘文, 戴迎春, 张惠
(湖南省人民医院 药学部, 湖南 长沙 410005)

摘要:目的 运用代谢组学方法考察决明子水提取物对高脂血症大鼠血液内源性代谢物的影响。**方法** 建立高脂血症大鼠模型, 采用决明子水提取物灌胃治疗, 利用主成分分析法和偏最小二乘 - 判别分析对空白对照组、模型组及治疗组大鼠血液进行代谢组学分析。观察 3 组代谢轮廓差异并寻找生物标志物。**结果** 利用主成分分析法和偏最小二乘 - 判别分析能将样本分开, 谱库分析得到 9 种生物标志物: L- 缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、富马酸、异亮氨酸、丝氨酸、硬脂酸、亚油酸和胆固醇。**结论** 基于气相色谱 - 质谱联用仪的代谢组学可以很好的从内源性代谢物的变化过程反应决明子水提取物对大鼠的调脂作用。

关键词: 高脂血症; 决明子; 代谢组学; 模式识别

中图分类号: R-332; R589.2

文献标识码: A

Metabonomic study on lipid regulative effect of Cassia*

Nan Deng, Sheng Yu, Wen Liu, Ying-chun Dai, Hui Zhang
(Department of Pharmacy, People's Hospital of Hunan, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To study the influences of Cassia aqueous extract on endogenous metabolites of blood in rats with hyperlipemia by using metabonomic method. **Methods** The rats were fed on fat diet to induce hyperlipemia, then treated with cassia aqueous extract. We analyzed metabolic finger print data of rats' plasma in the control, model and treated group. The plasma samples underwent preparation, derivation and GC/MS analysis. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed to detect the metabolic profile difference between the three groups. **Results** Through the metabonomic research, 9 biomarkers were found, which were L-valine, alanine, glycine, fumaric acid, isoleucine, leucine, serine, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and cholesterol. **Conclusions** Metabonomic study based on GC-MS shows a good recognition of the lipid regulating effect of cassia aqueous extract.

Keywords: hyperlipidemia; Cassia; metabonomic; pattern recognition

高脂血症是指由于体内脂质代谢紊乱而使得血浆脂质中一种或多种脂质的浓度超过正常值的一种病症。常因危害重要器官或组织而引起严重后果, 如冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、脑血管意外等, 是导致动脉粥样硬化的独立危害因素。目前临床上应用最为广泛的调脂药物包括各种他汀类药物, 如辛伐他汀和洛伐他汀等, 他汀类药物治疗高脂血症的同时可预防心脑血管意外事件^[1]。但长期或大

剂量使用他汀类药物可能会导致肝脏组织细胞生物化学变化或心脏横纹肌溶解等严重不良反应^[2-4]。

因此, 研究和开发安全、有效的新型降血脂药物具有重要的社会效益和经济效益。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门关于生物体系内源代谢物质种类、数量及其变化规律的科学^[5]。近年来, 代谢组学已被成功的应用于高脂血症的研究, 为高脂血症的诊断和治疗提供了有效帮助^[6-8]。

收稿日期: 2015-12-20

* 基金项目: 湖南省科学技术厅科技计划项目 (No: 2014TT2004)

决明子作为一种常见的中草药材,长期临床应用表明,其降脂作用明确,疗效可靠,副作用少,但与其他传统中药一样,存在着成分复杂、机制不十分清楚等缺点^[9-10]。在前人的基础上,本研究运用代谢组学方法探讨决明子水提物对高脂血症的逆转程度及调控作用,阐明决明子调脂作用的代谢物途径,为传统中药提供药效学理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Beckman AU5821 全自动生化分析仪(美国贝克曼公司),总胆固醇(total cholesterol,TC)、三酰甘油(triacylglycerol,TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(low-density lipoprotein,LDL-c)、高密度脂蛋白-胆固醇(high-density lipoproteins,HDL-c)测定试剂盒(北京九强生物技术有限公司提供),WH-2 微型旋涡混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司),TGL-16 低温高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司),岛津 GCMS-QP2010 气质谱联用色谱仪(日本 Shimadzu 公司),岛津 DB-5 熔融石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,日本 Shimadzu 公司)。

胆固醇(北京乐博生物科技有限公司),胆盐、蛋黄粉(北京奥博星生物技术有限责任公司),甲硫氧嘧啶(天津市博迪化工有限公司),决明子(源和堂中药饮片公司,经湖南省人民医院药剂科汪洋主管中药师鉴定为豆科植物决明 *Cassia Obtusifolia* L.的干燥成熟种子),2-异丙基苹果酸(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验动物

SD 雄性大鼠 36 只,体重(200 ± 20)g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2013-0004]。

1.3 实验方法

1.3.1 决明子水提液的制备 取决明子 100 g 置于宜煎容器中,加蒸馏水 250 ml 浸泡 0.5 h,加热煮沸,再小火持续加热 0.5 h,滤取药液,残渣加水 250 ml 同法煎煮,重复 2 次,合并 3 次煎出液,置于 50℃ 水浴锅中浓缩定容至 250 ml,制成生药含量 0.4 g/ml 的决明子水提物,置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 高脂血症大鼠模型制备及样品的采集与制备 适应环境 3 d 后将大鼠随机分成 2 组,正常对照组(12 只):普通饲料喂养;高脂血症模型组(24 只):高脂饲料(蛋黄粉 7%、猪油 7%、胆固醇 4%、胆酸钠 0.4%、丙硫氧嘧啶 0.3%及基础饲料 81.3%)喂养。

30 d 后眼底静脉丛取血检测其生化指标,确认造模效果。造模过程中高脂血症模型组死亡 3 只,将余下的 21 只随机分成 2 组,分别为模型组(10 只)和决明子组(11 只)。决明子剂量按 60 kg 成人常用量的 10 倍计算,决明子组灌胃决明子水提液 2 ml,相当于生药 0.8 g,约 2 g/(kg·d),正常组和模型组则给予等量安慰剂(羧甲基纤维素钠)。治疗 30 d 后眼底静脉丛取血,离心 10 min(4℃,12 000 r/min),取血浆置于 -80℃ 下保存,用于生化指标及气相色谱-质谱联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer-computer,GC-MS)检测。

1.4 生化指标分析

取 100 μl 血浆样本,利用 Beckman AU5821 全自动生化分析仪检测 TC、TG、LDL-c 及 HDL-c。相关操作步骤参考试剂盒使用说明书。

1.5 样品预处理与 GC-MS 分析

取血样室温解冻,取 100 μl 血浆样本,加入 10 μl 2-异丙基苹果酸/甲醇溶液(内标,1 mg/ml),涡旋 20 s,加入 300 μl 甲醇沉淀蛋白,涡旋 20 s,离心 15 min(4℃,12 000 r/min),取上清液置于玻璃离心管,常温下氮气吹干,加入 50 μl 甲氧胺吡啶溶液(15 mg/ml),涡旋 45 s,70℃ 水浴脗化 1 h,加入 100 μl 硅烷化试剂 N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺[bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide,BSTFA,内含 1% TMCS],涡旋 15 s,70℃ 水浴 1 h,冷却至室温,进样量 1 μl 进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件:进样口温度 280℃,初始柱温:70℃,保持 4 min,以 8℃/min 速度升温至 300℃,保持 3 min;接口温度:250℃;离子源温度:200℃;氦气作为载气,流速 1 ml/min,分流比 10:1,全扫描:35~850 m/z;溶剂切除时间:6.5 min。

1.6 统计学方法

生化指标结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,使用岛津色谱工作站对 GC-MS 总离子流图中各种代谢物的峰面积进行积分,利用 NIST107 和 NIST05 数据库对血浆中的代谢物进行鉴定,以相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的含量,得到 GC-MS 数据。各组灌胃给药前后的代谢物谱数据利用主成分分析法(principal component analysis,PCA)及偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminate analysis,PLS-DA)算法处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生化指标分析

附表列出了造模前后的比较,正常组造模前后 TC、LDL-c 变化不明显 ($P>0.05$),模型组造模前后 TC 与 LDL-c 显著升高 ($P<0.01$),表明造模成功。

2.2 GC-MS 数据分析

大鼠血浆 GC-MS 总离子流 (total ion-current, TIC)图,构成生物代谢物谱,如图 1 所示。鉴定结果,大鼠血浆中有 48 种内源性代谢物。

2.3 多元统计分析

2.3.1 PCA 结果 PCA 是一种经典的无监督代谢组学分析方法,常用于样本分类的初步分析。运用 SIMCA-P 11.0 软件对大鼠血浆中所有的内源性代谢物进行 PCA 分析,结果如图 2 所示。可以看出,正常组和高脂组可以达到分离,决明子组与模型组有分开的趋势且接近正常组,表明决明子可以改善高脂血症大鼠状况。然而样本分离效果不佳,且 PCA 对离群点敏感^[1],考虑选用更高要求的化学计量学模式识别方法。

2.3.2 PLS-DA 结果 PLS-DA 是代谢组学中常用的有监督的模式识别方法,相对于 PCA,PLS-DA 以预测均方误差为回归目标,使得预测结果的均方误差更小,更具可靠性^[2]。运用 SIMCA-P 11.0 软件对大鼠血浆内源性代谢物进行 PLS-DA 分析,结果如图 3 所示。可以看到正常组与模型组在第 1、2 主成分空间中得到了完全分离,决明子组向正常组靠近,

证明橙黄决明素具有较佳的调脂效果。

2.3.3 生物标志物的确定 运用 SIMCA-P 11.0 软件进行正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),得到 VIP 值图如图 4 所示,从大到小排序所有检测的质谱数据,VIP 值越大,说明该数据对区分该模型的贡献越大,选定为结构鉴定的对象。选取 VIP>1.5 且有统计学意义的变量 ($P<0.05$)作为生物标志物的判断标准,根据它们精确分子量和串联质谱结果和质谱数据库进行质谱信息匹配,对可能的生物标志物进行鉴定,再辅以标准品进行验证。结果得到以下 9 种生物标志物:L- 缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、富马酸、异亮氨酸、丝氨酸、硬脂酸、亚油酸和胆固醇。高脂饲料造模的过程中,大鼠血浆中甘氨酸、丝氨酸、硬脂酸及胆固醇含量上升,丙氨酸、L- 缬氨酸、异亮氨酸、富马酸及亚油酸则下降,与已有报道基本符合^[7]。决明子治疗 30 d 后,相应的变化得到回调,证明决明子通过调整体内部分氨基酸及游离脂肪酸而起到调脂作用。

附表 大鼠造模前后血脂指标 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC	TG	HDL-c	LDL-c
正常组 (n=10)				
造模前	2.13 ± 0.31	1.88 ± 0.50	0.79 ± 0.16	0.22 ± 0.02
造模后	2.23 ± 0.42	1.52 ± 0.36	0.89 ± 0.12	0.31 ± 0.11
模型组 (n=21)				
造模前	2.09 ± 0.29	2.17 ± 0.68	0.71 ± 0.15	0.20 ± 0.03
造模后	4.33 ± 0.65	0.71 ± 0.35	0.98 ± 0.14	1.77 ± 0.31

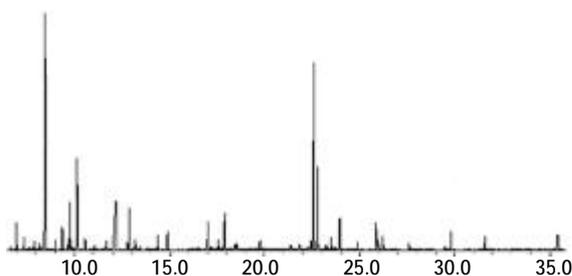


图 1 大鼠血浆 GC-MS 总离子流图

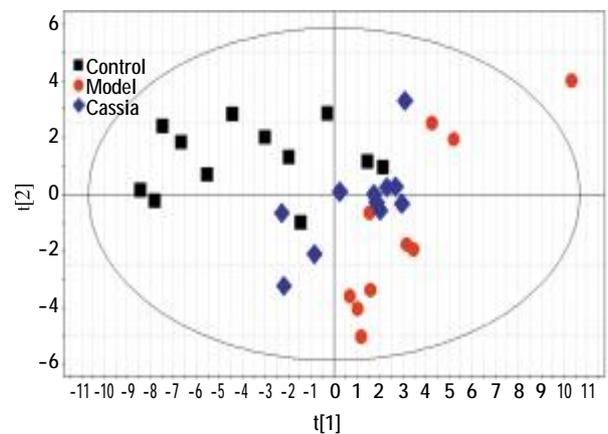


图 2 大鼠血浆样本的 PCA 投影图

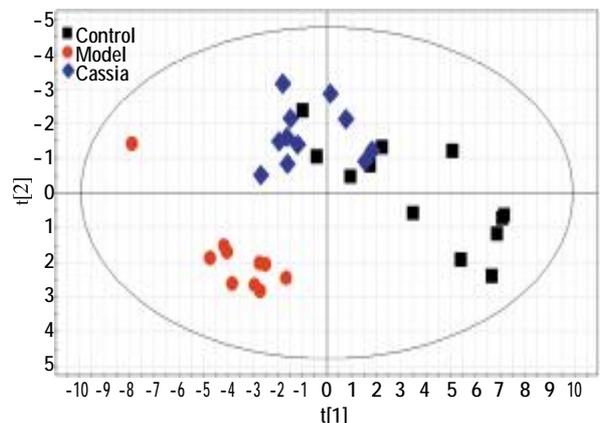


图 3 大鼠血浆样本的 PLS-DA 投影图

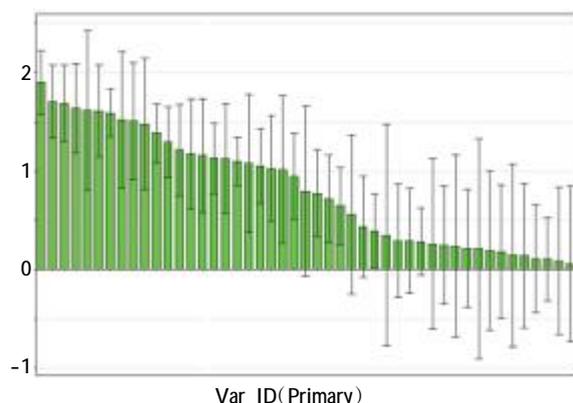


图 4 大鼠血浆样本的 VIP 值

3 讨论

决明子作为传统中药,其调脂作用显著。对比大鼠造模前后内源性代谢物的变化,得到潜在的生物标志物包括:L- 缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、富马酸、异亮氨酸、丝氨酸、硬脂酸、亚油酸和胆固醇。决明子水提物治疗 30 d 后,大鼠血浆中变化最明显的 9 种代谢物分别为:L- 缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、富马酸、异亮氨酸、丝氨酸、硬脂酸、苯丙氨酸和胆固醇,其中 8 种代谢物与得到的高脂血症生物标志物相同,变化均有回调趋势。证明了决明子作用于氨基酸及脂肪酸的代谢通路,能够达到较好的调脂作用。本研究利用基于 GC-MS 的代谢组学研究了决明子水提物治疗高脂血症大鼠血浆中代谢物的变化,多元统计分析从代谢物的水平证实了决明子可以较好地调节高脂血症大鼠的血脂,从而达到良好的降脂作用。

参 考 文 献:

- [1] 韦兵,吴洁,王元星,等.阿托伐他汀对高脂血症兔缺血再灌注心肌的保护作用[J].中国现代医学杂志,2009,19(9):1311-1314.
- [2] 刘甲兴,芮磊.他汀强化降脂的安全性问题及对策[J].心血管康复医学杂志,2009,18(1):91-93.
- [3] 朱虎成,陈春梅,赵德,等.他汀类药物导致的肌病及其致病机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2011,36(9):651-653.
- [4] 张冰,王莉莉.他汀类药物的临床应用及不良反应研究进展[J].国际药学研究杂志,2013,40(5):560-564.
- [5] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [6] Song X, Wang J, Wang P, et al. ¹H NMR-based metabolomics approach to evaluate the effect of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction on hyperlipidemia rats induced by high-fat diet[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 78-79: 202-210.
- [7] Chen H, Miao H, Feng YL, et al. Metabolomics in dyslipidemia[J]. Adv Clin Chem, 2014, 66: 101-119.
- [8] Gu S, Wang G, Zha W, et al. Metabonomic profiling of liver metabolites by gas chromatography-mass spectrometry and its application to characterizing hyperlipidemia [J]. Biomedical Chromatography, 2010, 24(3): 245-252.
- [9] 刘斌,巩鸿霞,肖学风,等.决明子化学成分及药理作用研究进展[J].药物评价研究,2010,33(4):312-315.
- [10] 王玲,刘丽宏,杨玉萍.复方决明子胶囊对高脂血症大鼠降脂作用的研究[J].中国药师,2009,12(10):1393-1395.
- [11] 肖应旺,杨军,张承忠,等.统计监控建群点检测数据预处理高效算法[J].仪器仪表学报,2013,33(12):2742-2746.
- [12] 吴雪梅,刘志强,张天龙,等.双模型结合进一步降低预测均方根误差和均方根相对误差的方法[J].分析化学,2015,43(5):754-758.

(张蕾 编辑)