论著

文章编号:1000-5404(2014)01-0038-04

甘遂毒性的血浆代谢组学研究

杨永霞[1],唐冰雯[2],丁佳佳[2],王琳琳[1],毋福海[3],宋粉云[2] (510006 广州,广东药学院:基础学院[1],药科学院[2],公共卫生学院[3])

[摘要] **目的** 研究甘遂毒性致大鼠血浆代谢组的变化,探讨代谢组学在中药毒性研究中的可行性。**方法** 选取SD大鼠18只,适应1周后按随机数字表法分为3组:对照组、甘遂低剂量组(7.875 g/kg)和甘遂高剂量组(15.75 g/kg),持续给予甘遂2周后,取各组大鼠血浆,收集各组血浆样品的^{1}H NMR谱,运用正交最小二乘判别(orthogonal partial least-squares-discriminant analysis, OPLS-DA)方法分析。**结果** 与对照组相比,甘遂组血浆代谢有明显变化。甘遂低剂量组血浆中乳酸和肌酸的含量升高($P<0.05$),脂、3-羟丁酸盐、牛磺酸和葡萄糖的含量降低($P<0.05$)。此外,丙氨酸、O-乙酰糖蛋白和氧化三甲胺在高剂量甘遂组中升高($P<0.05$),而不饱和脂肪酸则降低($P<0.05$)。**结论** 甘遂可引起机体能量代谢、氨基酸代谢和脂代谢紊乱。

[关键词] 甘遂;代谢组学;核磁共振氢谱
[中图法分类号] R282.71; R349.1; R994.39 [文献标志码] A

Plasma metabonomic changes induced by *Euphorbia Kansui* treatment based on ^{1}H NMR spectroscopy

Yang Yongxia[1], Tang Bingwen[2], Ding Jiajia[2], Wang Linlin[1], Wu Fuhai[3], Song Fenyun[2] ([1] School of Basic Courses, [2]College of Pharmacy, [3]School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To clarify the plasma metabonomic changes induced by Kansui treatment revealing the toxicity mechanism of Kansui. **Methods** Eighteen SD rats were divided into 3 groups, i. e., control, low dosage of Kansui group (7.875 g/kg) and high dose group (15.75 g/kg). After 2 weeks, the plasma samples were obtained, and ^{1}H NMR spectra was performed and analyzed by orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** There were some important changes in the plasma metabonomic profiles between Kansui treatment groups and control group. Plasma levels of lactate and creatine were increased($P<0.05$), and those of lipids, 3-hydrobutyrate, taurine and glucose were decreased in the 2 Kansui-treated groups($P<0.05$). Meanwhile, the levels of alanine, O-acetyl-protein and trimethylamine-N-oxide were also elevated ($P<0.05$), and that of unsaturated fatty acid was decreased in high dosage Kansui treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Kansui induces the metabolic disorders of energy metabolism, amino acid and lipid metabolism.

[**Key words**] Kansui; metabolomics; nuclear magnetic resonance ^{1}H spectroscopy

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21005022) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011010002512).
Corresponding author: Yang Yongxia, Tel: 86-20-39352197, E-mail: sheepma@163.com

甘遂收载于《中国药典》2010年版,为毒性中药之一[1-2],是大戟科(*Euphobiacea*)大戟属(*Euphorbia*)植物甘遂 *Euphorbia kansui T. N. Liou ex T. P. Wang* 的干燥块根,性寒,味苦;有毒,归肺、肾、大肠经,具有泻水逐饮的功能,被誉为"泄水圣药"。临床上常用于治疗晚期食管癌、乳腺癌等恶性肿瘤以及慢性支气管炎哮喘等症[3]。但是,作为一味毒性中药,甘遂在具备多种药理活性的同时也存在较大的毒副作用[4]。甘遂

[基金项目] 国家自然科学基金(21005022);广东省自然科学基金(S2011010002512)
[通信作者] 杨永霞,电话:(020)39352197,E-mail:sheepma@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1720.012.html(2013-11-21)

对肠道、口腔和皮肤有刺激作用,并出现麻痹呼吸和运动中枢的作用[5-6]。我们前期研究发现甘遂对肝脏和肾脏具有一定的毒性作用,导致其形态学改变[7]。

代谢组学是以组群指标分析为基础,以高通量检测和数据处理为手段,以信息建模与系统整合为目标的系统生物学的一个重要分支,能从整体上动态观察机体的代谢变化并指示生物体对内源或外源刺激的综合结果。中药"多组分、多靶点"的特点与代谢组学"整体性、系统性"的思想相一致,因此,在现代中药研究中,代谢组学被广泛应用到中药物质基础、作用机制和毒副作用等方面[8]。本研究通过利用基于核磁共振氢谱的代谢组学技术,深入研究甘遂对大鼠血浆代谢网络的干预,从整体上阐明甘遂致大鼠的毒性作用及其代谢调控机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠,SPF 级,雄性,购自广东省医学实验动物中心,体质量 180 ~ 220 g;动物许可证号:SGXK-(粤)2008-0002。动物常规喂养,自由饮水;室温(25 ± 1)℃,相对湿度(35 ± 75)%。

1.2 甘遂药材

本实验所用中药甘遂购自广东省广州市清平药材市场,并由广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定,证实其为大戟科植物甘遂(*Euphorbia kansui T. N. Liou ex T. P. Wang*)的干燥块根,俗称甘遂。

1.3 试剂

叠氮化钠(NaN_3)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),乙腈(CH_3CN)等均为国产分析纯。重水(D_2O)和含 TSP 的重水购自青岛腾龙科技有限公司。

1.4 实验仪器

Bruker AVANCE Ⅲ 500 MHz 超导液体 NMR 仪;ZH-2-BLENDER 振荡器(天津药典标准仪器制药厂);DL-360 超声波清洗器[宁波石浦海天电子仪器厂,频率(4.5 ± 0.225)kHz,功率 240 W];TGL-16G 台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);氮吹仪:KL512,金坛市盛蓝仪器制造有限公司。

1.5 甘遂水提液的制备

称取甘遂 800 g→洗净,加水 4 800 mL 煎煮至沸腾后 30 min→过滤→残渣加水 3 200 mL→煎煮至沸腾后 20 min→过滤→残渣加水 1 600 mL→煎煮至沸腾后 20 min 合并滤液→浓缩至 800 mL,得到甘遂水提取液的浓度为 1 g/mL。置于 4 ℃条件下保存,备用。

1.6 动物分组和给药剂量

18 只雄性大鼠,体质量为 180 ~ 220 g,按随机数字表法分为 3 个实验组,每组 6 只,大鼠自由饮水、摄取食物。经过适应饲养 1 周后,对甘遂组大鼠给予为期 14 d 的甘遂喂食,每天灌胃 1 次,根据临床剂量和我们前期的实验结果[7],灌胃剂量分别为 7.875 g/kg 和 15.75 g/kg;对照组给予相应体积的纯净水。

1.7 血浆的收集、数据采集和处理

在给予甘遂 14 d 后,对每组大鼠实施 10% 水合氯醛麻醉,摘眼球取血,并用肝素抗凝,进行离心处理得到血浆,于 -80 ℃ 冰箱保存,备用。NMR 测定前的血浆处理:血浆常温解冻后,离心(14 000 × *g*,10 min,4 ℃),取上清液,加入 100 μL 的重水,转入 5 mm 核磁管。混匀,于 4℃冰箱保存,备用。血浆测定使用 Bruker AVANCE Ⅲ 500 MHz 超低温探头核磁共振仪,调用 Carr-Purcell-Mei boom-Gill[recycle delay-90°-(τ-180°-τ)n-acquisition]脉冲序列。NMR 测定相关参数如下:回波时间 1 ms,谱宽 10 000 Hz,采样点数 64 k,采样累加次数 128 次,温度 298 K。自由感应衰减(free induction decay,FID)信号经过 32 k 傅立叶变换转为 NMR 谱图,后根据 COSY 和 HSQC 二维 NMR 谱和查阅文献[9 - 10]对 NMR 谱图中的各代谢物进行峰归属。将图谱文件夹导入 Topspin (Version2.0,Bruker Biospin),以乳酸峰(δ1.33)为化学位移参考峰,对图谱进行手动相位校正和基线校正并对所有的^{1}H CPMG 谱用 AMIX (Version2.0,Bruker Biospin,Germany)进行自动积分,积分区间 δ 0.5 ~ 9.0,积分间隔 0.005 ppm。为了消除剩余水峰引起的影响,将积分区间 δ 4.7 ~ 5.2 的积分值设为零。对产生的所有积分数据进行归一化处理,以 Excel 文件格式保存,用于进行模式识别分析。

1.8 模式识别分析

将归一化后的数值导入 SIMCA-P + 12.0 软件(Umetrics,Sweden)进行 OPLS-DA 的模式识别分析。分析结果用得分图(score plot)和载荷图(loading plot)表示。Score 图可以直观地给出各样本在空间上的位置,loading 图给出两类间的代谢物变化。本研究采用了 correlation coefficient coded-loading 相关图,将 OPLS-DA 模型中 loading 和 correlation coefficient 值直接导入本实验室编写的 MATLAB(The MathWorks,Inc,USA)脚本进行处理,得到相应的相关图。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对正常鼠和甘遂喂养鼠的血浆 NMR ^{1}H 谱的归一化积分值做 *t* 检验。

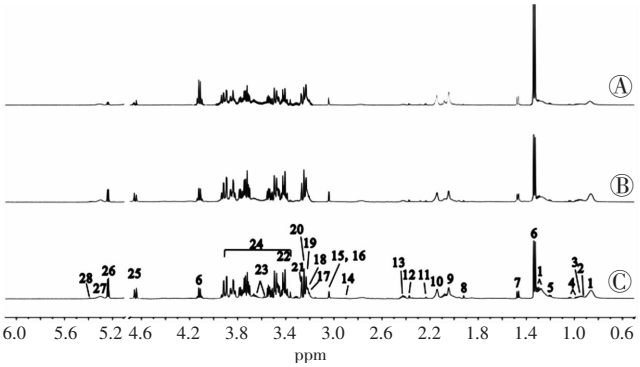
2 结果

2.1 大鼠血浆的^{1}H NMR 图谱

从图 1 可以看到,大鼠血浆中主要有乳酸、葡萄糖、脂类物质、氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸)等代谢物。与对照组比较,可以观察到甘遂组大鼠血浆中乳酸含量升高,而 α 和 β 葡萄糖的含量降低。为了进一步具体的分析大鼠血浆中代谢物的变化情况,我们采用模式识别方法进行分析。

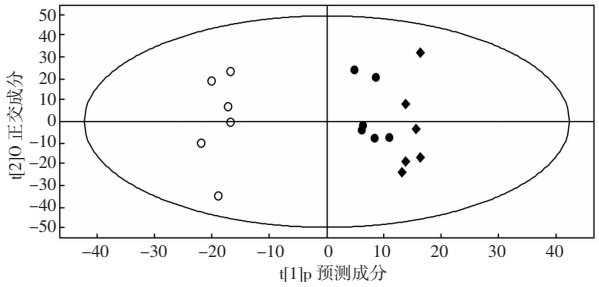
2.2 血浆代谢谱的模式识别分析

2.2.1 剂量-毒效的 OPLS-DA 分析 血浆代谢产物剂量-毒效的 OPLS-DA 分析见图 2,从图中可以看到各实验组区分明显,同时随着给予甘遂剂量的增加,相应的样本与对照组相距越远,说明分组趋势和剂量成正比关系。



A:15.75 g/kg 甘遂组;B:7.875 g/kg 甘遂组;C:对照组;1:脂类物质;2:亮氨酸;3:异亮氨酸;4:缬氨酸;5:3-羟丁酸盐;6:乳酸;7:丙氨酸;8:乙酸;9:N-乙酰糖蛋白;10:O-乙酰糖蛋白;11:乙酰乙酸;12:丙酮酸;13:2-氧化戊二酸;14:二甲胺;15:肌酸;16:肌酸酐;17:胆碱;18:磷酸胆碱;19:甘油磷酸胆碱;20:氧化三甲胺;21:甜菜碱;22:牛磺酸;23:丙三醇;24:葡萄糖和氨基酸;25:β-葡萄糖;26:α-葡萄糖;27:不饱和的脂类物质;28:糖原

图1 给予甘遂14 d对照组、7.875 g/kg甘遂组和15.75 g/kg甘遂组大鼠血浆的典型核磁图谱



○:对照组;●:7.875 g/kg甘遂组;◆:15.75 g/kg甘遂组

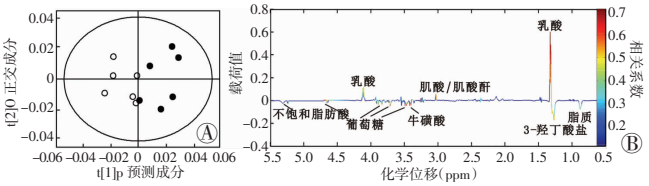
图2 给予甘遂第14天各组大鼠血浆OPLS-DA分析

2.2.2 代谢产物变化的分析 由于各实验组能够在t1维得到显著的区分,所以我们建立coefficient-coded loading负载图来表现代谢物的变化,可以更直观的识别与各个组别高度相关的代谢物,即造成2组样品差异的代谢物,从而对代谢变化进行解释。根据OPLS-DA得分图中各实验组的分组情况可知;负载图中正峰代表在给予甘遂后代谢物的含量升高,而负峰则说明在给予甘遂后代谢物的含量降低。颜色编码的相关系数值表示代谢物变化的显著性,颜色越靠近红色表示贡献率越大,即此物质在2组之间的差异越显著;颜色越靠近蓝色表示贡献率越小,对应的物质在2组之间的差异不显著。在本实验中,样本数为6,查阅相关系数临界表得到相关系数为0.707,则相关系数绝对值大于0.707这一临界值时代表该代谢物的变化具有显著性差异。给予甘遂14 d后大鼠血浆中小分子代谢物的变化情况见图3~5。

图3显示,通过7.875 g/kg甘遂组与对照组的比较,代谢物乳酸和肌酸/肌酐在7.875 g/kg甘遂组中是增加的,而脂质、3-羟丁酸盐、牛磺酸、葡萄糖和不饱和脂肪酸是降低的。

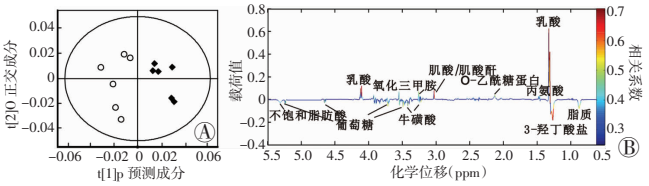
图4显示,通过15.75 g/kg甘遂组与对照组的比较,上述代谢物有进一步的变化,其变化的程度均比图3负载图中更加显著。此外,还发现丙氨酸、O-乙酰糖蛋白和氧化三甲胺含量升高。

图5是7.875 g/kg甘遂组和15.75 g/kg甘遂组比较的结果,从图中可以看到在15.75 g/kg甘遂组中,丙氨酸、肌酸/肌酐、葡萄糖、牛磺酸和乳酸显著升高。此外,3-羟丁酸盐是降低的。



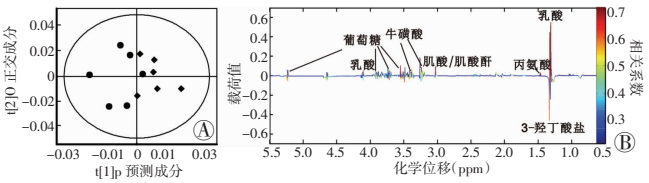
A:得分图 ○:对照组;●:7.875 g/kg甘遂组;B:7.857 g/kg甘遂组中代谢产物的变化

图3 给予甘遂14 d对照组和7.875 g/kg甘遂组大鼠血浆OPLS-DA分析



A:得分图 ○:对照组;◆:15.75 g/kg甘遂组;B:15.75 g/kg甘遂组中代谢产物的变化

图4 给予甘遂14 d对照组和15.75 g/kg甘遂组大鼠血浆OPLS-DA分析



A:得分图 ●:7.875 g/kg甘遂组;◆:15.75 g/kg甘遂组;B:15.75 g/kg甘遂组中代谢产物的变化

图5 给予甘遂14 d 7.875 g/kg甘遂组和15.75 g/kg甘遂组大鼠血浆OPLS-DA分析

2.3 归一化面积统计分析

对OPLS-DA分析中有较大变化的代谢物进行了统计学分析(表1),与对照组相比,7.875 g/kg甘遂组中具有统计性变化的代谢物是乳酸、肌酸、脂质、3-羟丁酸盐、葡萄糖和牛磺酸($P<0.05$);此外,丙氨酸、O-乙酰糖蛋白、氧化三甲胺和不饱和脂肪酸在15.75 g/kg甘遂组也具有显著性变化($P<0.05$)。

表1 对照组与甘遂组血浆代谢组归一化面积统计分析

代谢物	化学位移	T1	T2
脂质	0.88(t)	↓a	↓a
3-羟丁酸盐	1.26(d)	↓a	↓a
乳酸	1.33(d)	↑a	↑a
	4.11(q)		
丙氨酸	1.47(d)	–	↑a
O-乙酰糖蛋白	2.14(s)	–	↑a
肌酸/肌酸酐	3.03(s)	↑a	↑a
	3.93(s)		
氧化三甲胺	3.26(s)	–	↑a
葡萄糖	3.40~3.90	↓a	–
牛磺酸	3.27(t)	↓a	–
	3.42(t)		
不饱和脂肪酸	5.30(m)	–	↓a

a:$P<0.05$;T1:7.875 g/kg甘遂组与对照组比较;T2:15.75 g/kg甘遂组与对照组比较;↑代表升高,↓代表降低,–代表无显著变化

3 讨论

邓毅等[11]通过甘遂对小鼠血清 GPT、GOT、LDH 影响的实验研究,发现甘遂对小鼠肝脏产生明显损伤;对大鼠连续甘遂灌胃 7 d,发现甘遂能够引起心肌酶谱中肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶、γ-羟丁酸脱氢酶等的显著变化,表明甘遂引起心肌毒性[12];本课题组前期研究表明,甘遂灌胃 14 d 能够明显引起肝脏和肾脏的组织形态学改变[7]。因此,前人从细胞水平上[13]和动物水平上[11-12]都已经证实了甘遂具有明显的致炎、致泻、皮肤和胃黏膜刺激、损伤心肝肾等毒性。本研究是在前期研究基础上,应用基于磁共振波谱的代谢组学技术来研究甘遂对生物体整体代谢网络的干预,阐明甘遂毒性的代谢调控机制。

由上述分析得到:脂质、羟丁酸盐、乳酸、丙氨酸、O-乙酰糖蛋白、肌酸、氧化三甲胺、葡萄糖、牛磺酸和不饱和脂肪酸的变化最为显著,其中乳酸、丙氨酸、O-乙酰糖蛋白、肌酸和氧化三甲胺呈明显增加,而其他代谢产物则是显著性降低的,且甘遂的毒性与剂量呈正相关性。

线粒体的氧化磷酸化和胞质中的糖酵解是产生 ATP 的两种主要途径,当线粒体呼吸链功能遭受破坏时,会促使细胞通过糖酵解产生能量来维持正常的细胞功能。由于氧化磷酸化产能的效率远远大于糖酵解,所以,呼吸链功能极小的损失都需要极大的提高糖酵解的产能活性来弥补,从而维持能量平衡。本实验中给予甘遂喂食后大鼠血浆中葡萄糖的含量显著降低,同时血浆中乳酸含量的变化证实了糖酵解的加速作用,也说明了机体能量代谢的变化。乳酸是参与能量代谢和糖酵解过程的主要代谢物,它在给予甘遂组大鼠血浆中含量的显著增高表明了三羧酸循环的抑制和糖酵解作用的增强,说明机体能量代谢可能发生了紊乱[14]。线粒体作为三羧酸循环的主要场所,三羧酸循环的调控会使线粒体呼吸链功能受到影响。

给予甘遂后大鼠血浆中血脂蛋白和羟丁酸盐等物质含量的降低和乳酸含量的增加提示机体脂肪代谢障碍,并且随着甘遂剂量的增加,变化更加明显。而血浆中丙氨酸浓度的变化则可能是由于肝脏中氨基酸的代谢紊乱引起的。这是由于肝脏是体内氨基酸代谢的主要场所,当肝脏产生损伤时,可引起体内复杂的代谢紊乱,肝细胞内氨基酸代谢降低,进而导致血中氨基酸浓度增高。

糖蛋白与感染、肿瘤、心血管病、肝病、肾病、糖尿病以及某些遗传性疾病的发生和发展有关。细胞表面的糖蛋白可"脱落"到周围环境或进入血循环,它们可以作为异常的标志为临床诊断提供信息。从实验结果中可以看出,15.75 g/kg 甘遂的大鼠血浆中的 O-乙酰糖蛋白升高,可能是由于组织损伤而使 O-乙酰糖蛋白合成增加,而 O-乙酰糖蛋白在 7.875 g/kg 甘遂大鼠血浆中变化不明显,说明甘遂对大鼠肝脏的影响与剂量呈正相关。

肌酸酐是肌酸的代谢产物,含量基本恒定,大部分是从肾小球滤过,不被肾小管吸收,其变化主要反映肾小球的滤过功能。本实验中肌酸酐在甘遂给药组血浆中含量明显升高,且给予甘遂的剂量越高,肌酸酐升高越显著。肌酸酐的清除率在甘遂给药鼠肾脏中降低,说明甘遂使其肾小球的滤过功能降低,肾脏毒性明显。

综上所述,以代谢组学为核心技术,通过模式识别和多元统计分析,得到甘遂给药引起了大鼠血浆代谢物的显著变化,筛选出相关代谢标志物。从分子水平上更好地认识了甘遂对代谢网络的干预,为今后甘遂毒性的代谢调控机制研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 任子和, 杨瑶珺, 阎玉凝, 等. 我国药典 2010 年版一部毒性中药概况[J]. 首都医药, 2010(14): 15-16.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 83.
[3] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
[4] 曹雨诞, 张丽, 李媛, 等. 甘遂的毒性成分、炮制方法及炮制减毒机制的研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1817-1819.
[5] 黄海燕, 束晓云, 丁安伟, 等. 甘遂和醋甘遂醇提物及其不同极性部位的药效和毒性研究[J]. 中国药业, 2008, 17(17): 3-4.
[6] 耿婷, 黄海燕, 丁安伟, 等. 甘遂炮制前后各部位刺激性和泻下作用研究[J]. 中南药学, 2008, 6(4): 385-388.
[7] Tang B, Ding J, Wu F, *et al*. 1H NMR-based metabonomics study of the urinary biochemical changes in Kansui treated rat[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 134-142.
[8] 高玉桥, 苏丹. 毒性中药的代谢组学研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 3044-3045.
[9] 齐素文, 戴勇, 欧阳昕, 等. 轻微肝性脑病患者血清中代谢物组的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(23): 2503-2507.
[10] Jiang C Y, Yang K M, Yang L, *et al*. A ^{1}H NMR-based metabonomic investigation of time-related metabolic trajectories of the plasma, urine and liver extracts of hyperlipidemic hamsters[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66786.
[11] 邓毅, 宁艳梅. 甘草甘遂配伍对小鼠血清 GPT、GOT、LDH 影响的实验研究[J]. 中医研究, 2007, 20(3): 15-16.
[12] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 甘草甘遂伍用对大鼠心肝肾功能及形态的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1439-1441.
[13] 何益军, 石苏英, 金科涛, 等. 甘草与大戟甘遂芫花配伍对大鼠肝脏细胞色素 P4501A2 酶活性的影响[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(4): 278-280.
[14] Xu J, Zhang J, Dong J, *et al*. Metabonomics studies of intact hepatic and renal cortical tissues from diabetic db/db mice using high-resolution magic-angle spinning ^{1}H NMR spectroscopy[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(6/7): 1657-1668.

(**收稿**:2013-07-12;**修回**:2013-09-23)
(编辑 张 维)