

基于液相色谱-质谱的代谢组学方法 研究卷柏治疗高尿酸血症大鼠的作用机制

徐晨¹, 陈维佳², 于江洪³, 刘舒¹, 刘志强¹, 宋凤瑞¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022;

2. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021; 3. 吉林省东北亚药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700)

摘要:采用基于超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-QTOF/MS)的代谢组学方法研究卷柏治疗高尿酸血症大鼠的作用机制,运用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)方法对健康对照组、高尿酸血症模型组和卷柏组的大鼠尿液中内源性代谢物进行分析,寻找卷柏治疗高尿酸血症大鼠的潜在生物标记物。结果表明,经PCA和OPLS-DA分析后,健康对照组、高尿酸血症模型组和卷柏组的大鼠尿液代谢物谱能得到有效地区分;发现并鉴定了9个潜在生物标记物,分别为尿酸、尿囊素、黄尿酸、犬尿酸、硫酸吡啶酮、马尿酸、肌酐、富马酸和柠檬酸。卷柏对高尿酸血症大鼠的治疗主要体现在对嘌呤代谢、色氨酸代谢、三羧酸循环、精氨酸和脯氨酸代谢以及苯丙氨酸代谢的调节作用。同时,通过检测血清生化指标,表明卷柏能降低高尿酸血症大鼠的血尿酸水平,并起到保护肾脏的作用。

关键词:代谢组学;卷柏;高尿酸血症;液相色谱-质谱

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2016)05-0440-06

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2016.0018

Metabonomics Study of *Selaginella tamariscina* for Hyperuricemia in Rats Using UPLC-ESI-QTOF/MS

XU Chen¹, CHEN Wei-jia², YU Jiang-hong³, LIU Shu¹, LIU Zhi-qiang¹, SONG Feng-rui¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. Jilin Northeast Asia Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 133700, China)

Abstract: A urinary metabonomics method based on ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization quadruple time-of-flight/mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF/MS) was developed to study the effects of *Selaginella tamariscina* on hyperuricemic rats. Principal components analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) were applied to analyze the metabolites in

收稿日期:2015-09-28;修回日期:2015-11-09

基金项目:国家自然科学基金项目(21175128,81303280)资助

作者简介:徐晨(1988—),女(汉族),河南焦作人,博士研究生,药物分析专业。E-mail: xuchen214@126.com

通信作者:刘舒(1985—),女(汉族),山东菏泽人,副研究员,从事质谱分析研究。E-mail: mslab20@ciac.ac.cn

网络出版时间:2016-03-28;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160328.1443.020.html>

healthy control group (HCG), model group (MG) and *Selaginella tamariscina*-treated group (STG). The results show that significant differences in urinary metabolic profiles are observed from HCG, MG and STG by using PCA and OPLS-DA. And nine potential biomarkers including uric acid, allantoin, xanthurenic acid, kynurenic acid, indoxyl sulfate, hippuric acid, creatinine, fumaric acid and citric acid are found. Pathways of purine metabolism, tryptophan metabolism, tricarboxylic acid cycle, arginine and proline metabolism and phenylalanine metabolism are in response to the therapeutic effects of *Selaginella tamariscina*. Besides, the serum biochemical analysis demonstrated that *Selaginella tamariscina* can not only reduce the amount of uric acid but also protect the kidney of hyperuricemic rat.

Key words: metabonomics; *Selaginella tamariscina*; hyperuricemia; LC/MS

高尿酸血症是由于嘌呤代谢紊乱导致血尿酸升高的一种疾病,其诊断标准为血尿酸浓度男性高于 7.0 mg/dL,女性高于 6.0 mg/dL^[1]。高尿酸血症与内皮功能紊乱、心血管疾病及肾脏疾病等密切相关^[2-5]。该病多发于中年男性,但是近年来,随着人们生活方式和饮食结构的改变,年轻人和绝经女性的患病率逐渐增高^[6]。

目前,从天然资源中寻找治疗高尿酸血症的药物已成为药学的热点。其中,以黄嘌呤氧化酶为靶点,筛选抗痛风中药是现行的主流方法,并且取得了很好的研究进展。有研究表明,卷柏(*Selaginella tamariscina* (P. Beauv.) Spring)双黄酮提取物能够明显的抑制黄嘌呤氧化酶的活性^[7-8],但关于卷柏治疗高尿酸血症的整体作用机制尚无报道。

代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后,以其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系代谢途径的一门科学^[9]。该学科发展迅速,现已广泛应用于疾病诊断、药物研发、药物治疗、毒性评价等领域^[10-13]。液相色谱-质谱(LC/MS)联用技术,特别是超高效液相色谱-质谱(UPLC/MS)联用技术,因具有较高的灵敏度和分辨率,以及较宽的动态范围,而被广泛用于代谢组学研究。

本研究拟采用超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-ESI-QTOF/MS)检测经卷柏治疗的高尿酸血症大鼠尿液中代谢物的变化,通过主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)寻找潜在的生物标记物,并由此探索卷柏的作用机制。

1 实验部分

1.1 主要仪器

Waters Synapt G2 四极杆飞行时间质谱仪:美国 Waters 公司产品,配有 Acquity UPLC 系统、ESI 电喷雾离子源;Centrifuge 5810R 超速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 主要试剂

黄嘌呤:美国 Sigma 公司产品;氧嗪酸钾:成都西亚试剂有限公司产品;HE 染色(苏木精-伊红染色法)相关试剂:北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司产品;Masson 染色(马松三色染色法)试剂盒:南京建成生物研究所产品;卷柏:北京同仁堂制药有限公司产品;尿酸、尿囊素、黄尿酸、犬尿酸、硫酸吡啶酚、马尿酸、肌酐、富马酸和柠檬酸标准品:均为美国 Sigma 公司产品。

1.3 卷柏提取物的制备

卷柏粉碎,过 60 目筛后,加入 10 倍质量的水,浸润 40 min,然后回流提取 40 min;过滤出滤液后,再加入 10 倍质量的水,回流提取 40 min;合并 2 次滤液,于 50 °C 旋转蒸发浓缩后,冻干;冻干粉加水溶解后使用。

1.4 动物实验

18 只 Wistar 大鼠(体重 200~250 g),购于吉林大学实验动物中心,适应环境 7 天后,随机分成 3 组:1) 健康对照组(HCG):连续 13 天按照 0.5 mL/100 g 体重腹腔注射生理盐水,每日 2 次;2) 高尿酸血症模型组(MG):连续 13 天按照 0.5 mL/100 g 体重腹腔注射造模药(黄嘌呤和氧嗪酸钾均为 60 g/L 的混合液),每日 2 次;3) 卷柏组(STG):连续 13 天按照 0.5 mL/100 g 体重腹腔注射造模药(黄嘌呤和氧嗪酸钾均为

60 g/L 的混合液),每日 2 次,从第 4 天开始,按照 320 mg/100 g 体重灌胃给药卷柏提取物,一日 1 次,连续 10 天。

1.5 样品收集与制备

在实验第 13 天收集大鼠的 18 h 尿液,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,冷冻贮藏于 -80 °C 冰箱中。样品检测前,在 4 °C 冰箱中解冻尿液样品,经 0.22 μm 滤膜过滤,取上清液,用超纯水以 1:10 (V/V) 稀释,供 UPLC-ESI-QTOF/MS 测定。

在实验第 3 天,取大鼠眼眶血,备用;第 14 天,处死大鼠,取血液;2 次所得的血液均以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为血清储备液,冷冻贮藏于 -80 °C 冰箱中。

1.6 实验条件

1.6.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(1.7 μm×2.1 mm×50 mm);流动相:A 为 0.1% 甲酸-水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱:0~5 min、5% B~20% B,5~8 min、20% B~50% B,8~10.5 min、50% B~100% B;流速 0.4 mL/min;进样室温度 4 °C;柱温 35 °C;进样量 5 μL。

1.6.2 质谱条件 Waters Synapt G2 四极杆飞行时间质谱仪,正离子模式毛细管电压 2.5 kV,负离子模式毛细管电压 2.0 kV,锥孔电压 40 V,萃取锥电压 2.0 V,离子源温度 120 °C,脱溶剂气温度 400 °C,锥孔气流速 50 L/h,脱溶剂气流速 800 L/h,质量扫描范围 m/z 100~1 000,碰撞能量 10~40 eV。测样前,使用甲酸钠进行校正,采用分辨率模式;测样时,采用 2 μg/L 亮氨酸脑啡肽实时校正,15 s 校正 1 次,每次采集亮氨酸脑啡肽信号 0.5 s,亮氨酸脑啡肽进样流速 5 μL/min。

1.7 数据处理

样品经 UPLC-ESI-QTOF/MS 检测获得

原始数据,采用 Markerlynx XS v4.1 软件进行峰检测、峰对齐以及归一化。以精确分子质量-保留时间和归一化后的峰面积建立数据矩阵,数据矩阵导入多变量统计软件 SIMCA-P (Umetrics, Umeå, Sweden) 中进行 PCA 和 OPLS-DA 多元变量分析。使用生物学数据库,如 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>),METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>),Massbank (<http://www.massbank.jp/>) 和 KEGG (<http://www.kegg.com/>) 进行生物标记物的鉴定和代谢通路的分析。

1.8 血清生化指标及肾组织切片检测

大鼠血清中尿酸及肌酐的含量测定采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(UPLC-TQ-MS),具体实验步骤参见文献[14]。

2 结果与讨论

2.1 血清生化指标检测

血清生化指标检测结果列于表 1。可以看出:在实验第 3 天,模型组和卷柏组的血尿酸含量显著升高,表明高尿酸血症模型成功建立;在第 14 天,即经过 10 天的卷柏给药,卷柏组的血尿酸含量相对模型组降低,表明卷柏具有降低高尿酸血症大鼠血尿酸的作用。通常,血清肌酐含量可作为衡量肾脏功能的指标,在第 14 天,模型组血清肌酐含量与健康组相比升高,表明模型组大鼠的肾脏功能受损,而卷柏组大鼠的血清肌酐含量相对模型组降低,说明卷柏具有保护肾脏的作用。

2.2 尿液代谢物谱分析和潜在生物标记物鉴定

采用 UPLC-ESI-QTOF/MS 法进行尿液样品的分离和数据采集,并对数据进行 PCA 和 OPLS-DA 分析,PCA 在正离子模式和负离子模式下的得分图示于图 1。可以看出,健康对照组、模型组和卷柏组能完全分开,表明这 3 组

表 1 血清尿酸和血清肌酐的浓度(平均值±SD, n=6)

Table 1 Concentrations of serum uric acid and serum creatinine (Mean±SD, n=6)

组别	血清尿酸(第 3 天)/(μmol/L)	血清尿酸(第 14 天)/(μmol/L)	血清肌酐(第 14 天)/(μmol/L)
健康对照组(HCG)	137.70±23.54*	127.07±29.85*	8.28±0.74**
模型组(MG)	225.78±16.21	234.20±25.22	16.94±4.66
卷柏组(STG)	240.46±22.37	180.17±47.15**	10.76±1.45**

注:*表示与模型组相比 $P<0.01$; **表示与模型组相比 $P<0.05$

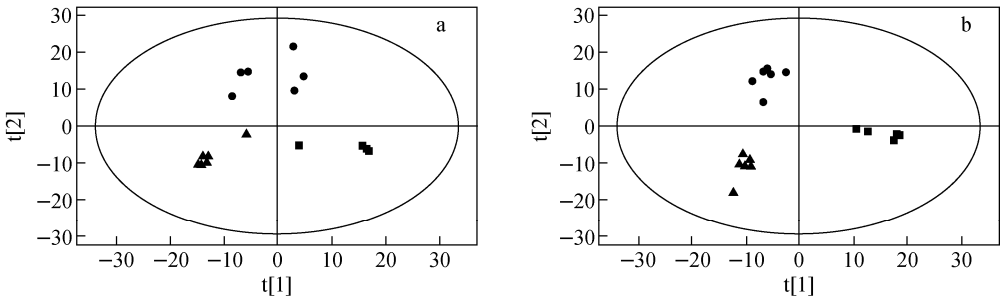


图 1 健康对照组、模型组和卷柏组在正离子模式(a)和负离子模式(b)下的 PCA 得分图

Fig. 1 PCA score plots of HCG, MG and STG in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

大鼠的尿液代谢物谱发生了明显变化。为了更好的区分并找到影响分组的代谢物,采用 OPLS-DA 法研究模型组和卷柏组大鼠的代谢物谱差异。

OPLS-DA 在正离子模式和负离子模式下的得分图分别示于图 2,可以看出,模型组和卷柏组有明显区别,经卷柏给药后大鼠的代谢状况发生了明显改变。模型组和卷柏组在正离子模式和负离子模式下的 S-plot 示于图 3,每个点表示 1 个化合物,离原点距离越远表示这个化合物对模型组和卷柏组大鼠分组的贡献越大。选择 VIP 值大于 1 的代谢物为潜在生物标

记物,共找出了对模型组和卷柏组分类贡献较大的 9 个化合物,即卷柏治疗高尿酸血症大鼠的潜在生物标记物。根据质荷比和串联质谱数据,并与标准品和数据库进行比较,鉴定出 9 个潜在生物标志物,结果列于表 2。以负谱 m/z 212.0027 代谢物为例说明鉴定过程:首先,准分子离子峰的质荷比为 212.0027,经计算其化学式为 $C_8H_7NO_4S$,此代谢物初步鉴定为硫酸吲哚酚;由串联质谱图可知,此代谢物有 2 个碎片离子 m/z 132.05 和 m/z 79.96,经计算,这 2 个碎片离子分别为 $[M-H-SO_3]^-$ 和 $[SO_3]^-$; 综上,鉴定此代谢物为硫酸吲哚酚。

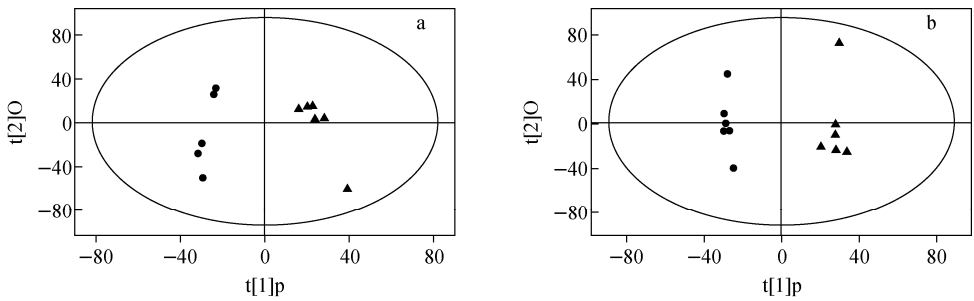


图 2 模型组和卷柏组在正离子模式(a)和负离子模式(b)下的 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 OPLS-DA score plots of MG and STG in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

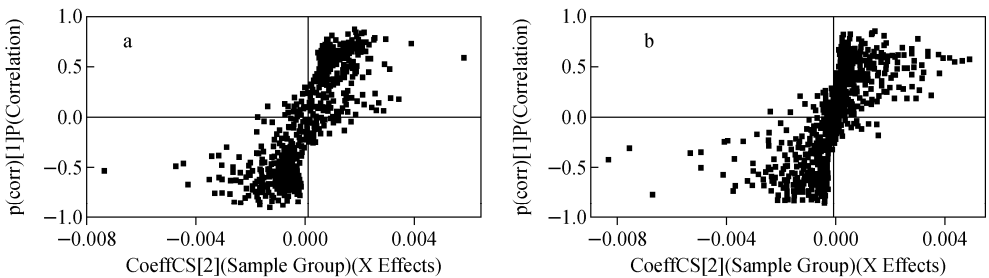


图 3 模型组和卷柏组在正离子模式(a)和负离子模式(b)下的 S-plot

Fig. 3 S-plots of OPLS-DA for MG and STG in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

表 2 卷柏治疗高尿酸血症大鼠的潜在生物标志物

Table 2 Potential biomarkers of *Selaginella tamariscina* treated hyperuricemic rats

模式	VIP 值	化合物	分子式	测定质荷比 <i>m/z</i>	理论质荷比 <i>m/z</i>	误差/ 10^{-6}	串联 质谱	变化 趋势*	变化 趋势**	变化 倍数*	变化 倍数**
正离子	1.34	肌酐	C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0663	114.0662	+0.88	44.10	上调	下调	2.06	1.94
	2.52	黄尿酸	C ₁₀ H ₇ NO ₄	206.0443	206.0448	-2.43	160.04	上调	下调	1.74	1.84
	2.04	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	180.0658	180.0655	+1.67	105.05, 77.02	上调	下调	1.79	1.67
	2.21	犬尿酸	C ₁₀ H ₇ NO ₃	190.0500	190.0499	+0.53	144.05, 116.06	上调	下调	1.93	1.71
	1.16	尿囊素	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	159.0511	159.0513	-1.26	61.04, 99.03	上调	下调	2.48	2.03
负离子	5.17	硫酸吡 啶酚	C ₈ H ₇ NO ₄ S	212.0027	212.0023	-1.89	132.05, 79.96	上调	下调	4.94	2.69
	2.27	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	191.0200	191.0197	+1.57	111.01	下调	上调	1.51	1.28
	5.57	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	167.0214	167.0211	+1.80	124.02, 96.02, 69.01	上调	下调	3.01	1.89
	1.12	富马酸	C ₄ H ₄ O ₄	115.0036	115.0037	-0.87	71.10	下调	上调	1.47	1.68

注: * 为模型组 vs 健康对照组, $P < 0.05$; ** 为卷柏组 vs 模型组, $P < 0.05$

2.3 卷柏治疗高尿酸血症大鼠作用机制分析

实验表明,卷柏给药组大鼠尿液中的尿酸含量明显降低,说明卷柏有降低尿酸的作用。尿酸是人类嘌呤代谢的终产物,但大鼠体内存在将尿酸氧化为尿囊素的尿酸酶。本研究采用氧嗪酸钾抑制尿酸酶活性来造模,但是尿酸能够通过非酶途径被氧化为尿囊素,因此尿囊素含量的变化也代表了尿酸含量的变化。

黄尿酸、犬尿酸以及硫酸吡啶酚是色氨酸代谢通路的重要代谢物。已有研究^[15-16]表明,在肾功能不全的大鼠体内,黄尿酸和犬尿酸的含量会升高。硫酸吡啶酚是吡啶酚的二相代谢产物,其在慢性肾病大鼠血清中明显升高^[17]。在本研究中,黄尿酸、犬尿酸以及硫酸吡啶酚在模型组中含量升高,除此以外,与肾损伤有关的标记物,包括精氨酸和脯氨酸代谢通路的肌酐和苯丙氨酸代谢通路的马尿酸也都在模型组中上调。这些代谢物含量的变化都表明,模型组大鼠具有肾脏损伤。在卷柏组,这些与肾脏功能相关的代谢物含量都下调,表明卷柏能够起到保护肾脏的作用。

富马酸和柠檬酸是三羧酸循环的重要中间

物。三羧酸循环是能量代谢的重要组成部分,是能量物质(如糖、脂肪酸和氨基酸)氧化的途径。在模型组中,富马酸和柠檬酸含量降低,说明高尿酸血症大鼠体内能量代谢异常;在卷柏组中,富马酸和柠檬酸含量相比模型组均有上调,表明卷柏能够调节高尿酸血症大鼠的能量代谢。

3 结论

本研究采用基于 UPLC-ESI-QTOF/MS 的代谢组学方法研究了卷柏治疗高尿酸血症大鼠的尿液代谢谱变化,并检测了大鼠的血清生化指标。结果表明,卷柏调节了高尿酸血症大鼠的 9 个代谢物,包括尿酸、尿囊素、黄尿酸、犬尿酸、硫酸吡啶酚、马尿酸、肌酐、富马酸和柠檬酸,这些潜在生物标志物的变化趋势反映了卷柏在嘌呤代谢、色氨酸代谢、三羧酸循环、精氨酸和脯氨酸代谢以及苯丙氨酸代谢的调节作用。

参考文献:

[1] FLANDERS M M, CRIST R A, ROBERTS W

- L, et al. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays[J]. *Clinical Chemistry*, 2005, 51(9): 1 738-1 742.
- [2] BECKER M A, JOLLY M. Hyperuricemia and associated diseases[J]. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 2006, 32(2): 275-193.
- [3] KHOSLA U M, ZHARIKOV S, FINCH J L, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction[J]. *Kidney International*, 2005, 67(5): 1 739-1 742.
- [4] JIN M, YANG F, YANG I, et al. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases[J]. *Frontier in Bioscience*, 2012, 17: 656-669.
- [5] AVRAM Z, KRISHNAN E. Hyperuricaemia-where nephrology meets rheumatology[J]. *Rheumatology*, 2008, 47(7): 960-964.
- [6] SHIBASAKI K, KIMURA M, IKARASHI R, et al. Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(3): 484-491.
- [7] 黎莉,陈科力,朱田密,等. 卷柏属 7 种药用植物的提取物抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究[J]. *中药材*, 2007, 30(4): 445-447.
- LI Li, CHEN Keli, ZHU Tianmi, et al. Study on xanthine oxidase inhibitory activities in vitro of seven kinds of extracts from *Salaginella pulvinata* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(4): 445-447(in Chinese).
- [8] 朱田密,陈科力,黎莉,等. 垫状卷柏中双黄酮抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(4): 33-34.
- ZHU Tianmi, CHEN Keli, LI Li, et al. Study on xanthine oxidase inhibitory activities in vitro of bioflavonoids from *Salaginella pulvinata* [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2007, 23(4): 33-34(in Chinese).
- [9] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1 181-1 189.
- [10] 谷金宁,牛俊,皮子凤,等. 尿液代谢组学方法研究人参皂苷治疗糖尿病心脏病大鼠作用机制[J]. *分析化学*, 2013, 41(3): 371-376.
- GU Jinning, NIU Jun, PI Zifeng, et al. A urinary metabonomics research on total ginsenoside treated diabetes cardiomyopathy rats based on rapid resolution liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(3): 371-376(in Chinese).
- [11] WANG X, ZHANG A, SUN H. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 2 072-2 077.
- [12] WANG X, WANG H, ZHANG A, et al. Metabolomics study on the toxicity of Aconite Root and its processed products using ultraperformance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and ingenuity pathways analysis[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(2): 1 284-1 301.
- [13] QI Y, LI S, PI Z, et al. Metabonomic study of Wu-tou decoction in adjuvant-induced arthritis rat using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 953/954(5): 11-19.
- [14] 马青山,王茜,赵凯妹,等. UPLC-MS/MS 法测定高尿酸血症大鼠血清及尿液中的尿酸和肌酐[J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(12): 2 716-2 720.
- MA Qingshan, WANG Qian, ZHAO Kaishu, et al. UPLC-MS/MS method for determination of uric acid and creatinine in serum and urine of hyperuricemic mice[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2013, 34(12): 2 716-2 720(in Chinese).
- [15] PAWLAK D, TANKIEWICZ A, BUCZKO W. Kynurenine and its metabolites in the rat with experimental renal insufficiency[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2001, 52(4): 755-766.
- [16] PAWLAK D, TANKIEWICZ A, MATYS T, et al. Peripheral distribution of kynurenine metabolites[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2003, 54(2): 175-189.
- [17] MIYAZAKI T, AOYAMA I, ISE M, et al. An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF- β 1 in uraemic rat kidneys[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2000, 15(11): 1 773-1 781.