

· 论著 ·

芪附汤对大鼠抗阿霉素心脏毒性作用的血清气相色谱-质谱代谢组学研究

周倩¹, 刘奎², 马静¹, 谭光国³ (1.空军军医大学第一附属西京医院中医科, 陕西 西安 710032; 2.空军军医大学基础医学院学员一旅, 陕西 西安 710032; 3.空军军医大学药理学系药物分析学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 采用基于气相色谱-质谱(GC-MS)血清代谢组学技术研究芪附汤抗阿霉素心脏毒性的作用,并初步探讨其作用机制。**方法** 将24只大鼠分为正常组、阿霉素组和芪附汤治疗组,给予4周相应的干预治疗后,采集大鼠血清进行GC-MS分析,结合多变量和单变量统计分析,研究阿霉素诱导的心脏毒性损伤大鼠血清中内源性代谢物的变化,以及芪附汤对其的干预作用,寻找其抗阿霉素心脏毒性潜在的生物标志物,采用代谢通路分析鉴定芪附汤靶向代谢通路。**结果** GC-MS血清代谢组学分析鉴定了17种阿霉素心脏毒性潜在生物标志物,芪附汤对其中10种代谢物具有显著的逆转作用,代谢通路分析表明,三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢(简称二羧酸代谢)、花生四烯酸代谢是芪附汤主要的靶向代谢通路。**结论** 芪附汤能够通过调节失衡的三羧酸循环、二羧酸代谢和花生四烯酸代谢而发挥抗阿霉素心脏毒性的作用。

[关键词] 阿霉素;心脏毒性;芪附汤;代谢组学;气相色谱-质谱

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0313-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.006

Protective effect of Qifu decoction on adriamycin-induced cardiac injury based on GC-MS serum metabolomics

ZHOU Qian¹, LIU Kui², MA Jing¹, TAN Guangguo³ (1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Cadets Brigade, Basic Medicine College, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the protective effect of Qifu decoction (QFD) on adriamycin-induced cardiac injury based on GC-MS serum metabolomics and explore its mechanism. **Methods** Twenty-four rats were randomly divided into three groups: control group, Adriamycin-induced model group and QFD-treated group. The QFD-treated group received QFD for 4 weeks. After 4 weeks, the serum samples of each rat were collected and analyzed by GC-MS. Combination GC-MS with multivariate and univariate statistical analysis was applied to identify potential biomarkers related with adriamycin-induced cardiac injury and QFD-reversed biomarkers. Metabolic pathway analysis was employed to identify QFD-targeted metabolic pathways. **Results** 17 metabolites were identified as potential biomarkers related with adriamycin-induced cardiac injury based on GC-MS serum metabolomics analysis and 10 metabolites were significantly reversed by QFD. QFD-targeted metabolic pathways were identified by metabolic pathway analysis with MetaboAnalyst, which were citrate cycle, glyoxylate and dicarboxylate metabolism and arachidonic acid metabolism. **Conclusion** QFD administration provided protective effects on adriamycin-induced cardiac injury through partially regulating the perturbed citrate cycle, glyoxylate and dicarboxylate metabolism and arachidonic acid metabolism.

[Key words] adriamycin; cardio-toxicity; Qifu decoction; metabolomics; GC-MS

阿霉素(adriamycin,ADR)是目前临床常用广

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773677, 81402888)

[作者简介] 周倩,硕士,医师,研究方向:方剂配伍及药效机制研究,Tel: 18729862661, Email: jingzhou81@126.com

[通讯作者] 马静,博士,副教授,研究方向:方剂配伍及药效机制研究,Tel: 18602933036, Email: jingma@fmmu.edu.cn;谭光国,博士,讲师,研究方向:药物代谢组学研究,Tel: 18706819001, Email: guangguotan@gmail.com

谱的抗肿瘤药物。然而,由于阿霉素具有严重的心脏毒副作用,容易导致充血性心力衰竭,其临床使用经常受到限制^[1]。因此,寻找抗阿霉素的心脏毒性损伤的药物已成为亟待解决的问题。芪附汤源自北宋《魏氏家藏》的古方,由黄芪、附子两味药物以2:1的比例组成,于彩娜等^[2,3]研究发现芪附汤对阿霉素诱导的大鼠心脏毒性损伤的保护作用与其抗氧化应激有关。范颖等^[4]研究发现芪附汤通过抑制线粒

体途径的细胞凋亡,保护心肌抑制阿霉素心脏毒性损伤。这些研究都证实芪附汤具有改善心肌功能的作用,可以有效降低阿霉素的心脏毒性作用。但对其作用机制研究仍然不够深入。

代谢组学是近年来迅速发展的小分子系统生物学方法^[5],它能提供机体的整体代谢状态,与中药复方“多途径”、“多层次”、“多靶点”的整体作用理论相一致^[6]。运用代谢组学研究中药,对认识中药的药效和作用机制具有重要意义。因此,本研究采用GC-MS血清代谢组学技术,检测经芪附汤治疗的阿霉素心肌病大鼠血清中代谢物的变化,通过多变量统计分析寻找潜在生物标志物,综合评价芪附汤抗阿霉素心脏毒性的作用,以期从整体、多靶点等层面,深入阐释芪附汤抗阿霉素心脏毒性的作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo-Finnigan Trace DSQ 气相色谱-质谱联用仪(Thermo Electron Corporation)。

1.2 试剂

乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶试剂盒(CK)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)购自南京建成生物科技有限公司。甲氧胺盐酸盐、N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺(MSTFA)、三甲基氯硅烷(TMCS)、吡啶、正庚烷、柠檬酸购自Sigma-Aldrich公司(St Louis, MO, USA)。乳酸、丙氨酸、缬氨酸、琥珀酸、苹果酸、苏氨酸、苯丙氨酸、果糖、葡萄糖、油酸、硬脂酸和花生四烯酸均购自上海晶纯试剂有限公司。附子(产地:四川)、生黄芪(产地:内蒙古)购自北京同仁堂药房(西安)。

1.3 实验动物

洁净级SD雄性大鼠24只,体重(200±12)g,空军军医大学实验动物中心提供。大鼠饲养于12h/12h昼夜的房间里,给予标准饲料,恒温26~28℃,相对湿度为40%。

2 方法

2.1 芪附汤原液的制备

称取生黄芪60g,制附子30g,采用6倍体积的沸水法提取2次,每次提取2h,合并2次提取液,减压浓缩至浓度为0.45g/ml(相当于含生黄芪0.3g和制附子0.15g)的芪附汤溶液。

2.2 阿霉素心脏毒性损伤大鼠模型的建立及分组给药

24只SD大鼠(正常组、阿霉素组、芪附汤治疗

组),每组8只。正常组:腹腔注射200μl生理盐水;阿霉素组:每周腹腔注射阿霉素2.5mg/kg,每周1次,连续4周,累计剂量10mg/kg。芪附汤治疗组:根据60kg人体标准体重芪附汤的每日临床治疗量(生黄芪30g,制附子15g),按动物标准换算公式,大鼠的有效量相当于生黄芪3g/kg、制附子1.5g/kg,折合芪附汤为10ml/kg。在阿霉素造模的同时,每日灌胃给予芪附汤原液2ml,每日1次,连续4周。

2.3 样本收集

经芪附汤干预治疗4周后,大鼠眼眶取血,血样在室温下放置45min,4℃下3000r/min离心15min,得到血清。将血清分成两份:一份用于血清酶分析;另一份置于-80℃冰箱用于代谢组学分析。代谢组学质量控制样品(quality control samples, QCs)取自合并等量不同大鼠的血清。

2.4 样品制备

将冻存的血清于室温下融化,取100μl血清,加入600μl甲醇,涡旋1min,在冰水浴中超声提取10min,4℃下12000r/min离心15min。放置于4℃冰箱中待进样。4℃超声抽提10min,4℃13000r/min离心15min,取上清液400μl转移到玻璃管N₂吹干,衍生化前50℃烘干15min。衍生化,将15μg/μl的甲氧胺吡啶溶液75μl,涡旋5min,70℃烘箱放置1h;75μl MSTFA(含1% TMCS),涡旋5min,室温1h;加入200μl正庚烷,涡旋30s,4000r/min离心10min,取上清液200μl至样品瓶。

2.5 GC-MS分析

GC-MS分析进样量1.0μl,TR-5MS毛细管柱(30m×250μm×0.25μm)、载气为氦气,柱流速为1ml/min,进样口温度为260℃;接口温度为260℃;离子源温度为200℃;四级杆温度150℃,EI离子源70eV;采用全扫描模式,m/z:60~600;程序升温条件:70℃保持3min,以4℃/min升至220℃,然后12℃/min升至310℃后保持10min。

2.6 进样序列

样品分为8个进样小组进样,每小组的3个样品分别取自正常组、阿霉素组、芪附汤治疗组,每个小组内采用随机方式进样,每个小组之间进样一次QCs,用于监测分析系统的稳定性。

2.7 代谢组学数据处理

原始数据经Thermo Xconvert软件转换为通用数据格式NetCDF,转换后的数据进一步通过XCMS软件包进行峰校正和峰积分^[7]。XCMS参数除

设定 $fwhm=10$, $bw=2$ 和 $snthersh=5$ 以外,其他参数均采用默认值。经 XCMS 处理获得矩阵,导入 Excel 中对数据进行归一化处理,采用 SIMCA-P V14.1 (Umetrics, Sweden) 软件,进一步进行中心化和标准化处理,然后进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。通过 S-plot 载荷图寻找生物标志物,对差异代谢物做进一步双侧 t 检验分析(阿霉素组与正常组)和方差分析($P<0.05$)。代谢物的鉴定通过标准质谱数据库(NIST Database)检索匹配,并采用对照品对部分代谢物进行确认。

2.8 芪附汤潜在靶向代谢通路分析

潜在生物标志物的代谢通路分析采用基于网页

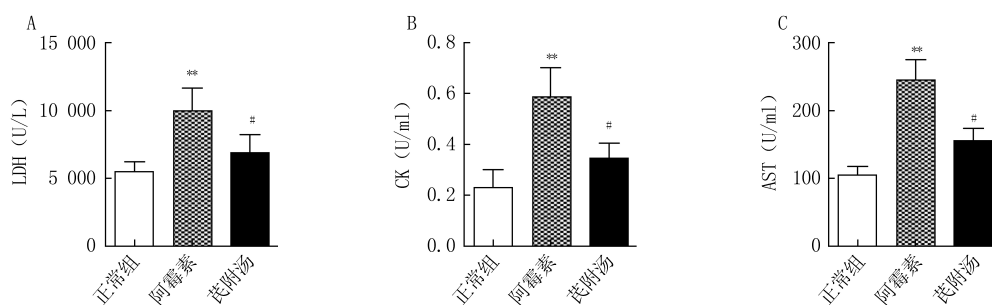


图1 大鼠血清中 LDH(A)、CK(B)和 AST(C)的测定结果

** $P<0.01$,与正常组比较;# $P<0.05$,与阿霉素组比较

3.2 GC-MS 分析方法稳定性评价

GC-MS 血清代谢指纹谱的稳定性评价采用 QCs 进行分析^[9]。不同组样品与 QCs 通过 XCMS 校正、积分、提取特征离子峰,一共得到 362 个离子峰,在 9 个 QCs 分析中,采用 0.8 规则和峰面积相对标准偏差小于 30% 提取变量^[9],最终获得 328 个变量的数据集,占总变量数的 90.1%,由此可见,本研究建立的 GC-MS 分析方法重复性良好。无监督的 PCA 进一步显示 9 个 QCs 紧密聚集在一起(图 2),这也证实了 GC-MS 分析系统稳定性良好。

3.3 阿霉素心脏毒性潜在生物标志物的鉴定

为了考察阿霉素心脏毒性模型大鼠血清代谢物的变化,将正常组大鼠和阿霉素组大鼠的 GC-MS 数据进行 OPLS-DA,得出反映两组大鼠组间离散程度的得分图(图 3A)和寻找相关生物标志物的 S-plot 载荷图(图 3B)。由得分图可知,正常组与阿霉素组大鼠能实现明显分离,表明阿霉素组大鼠血清代谢谱明显紊乱。根据 S-plot 载荷图找到了对 2 组分离贡献较大的代谢物(离原点越远贡献越大),结合峰面积相对强度的双侧 t 检验分析,确定潜在的生物标志物,最终一共鉴定了 17 种阿霉素心

来源的 Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>)软件进行分析^[8]。

3 结果和讨论

3.1 生物化学指标的测定

乳酸脱氢酶(LDH)、肌磷酸激酶(CK)和门冬氨酸氨基转移酶(AST)是判别心肌损伤的专属酶,当心肌细胞受损时,这些酶将大量释放进入血液。血清中 LDH、CK 和 AST 的测定结果如图 1 所示,与正常组相比,阿霉素组血清中 LDH、CK 和 AST 显著升高。与阿霉素组相比,芪附汤治疗组能够明显降低 LDH、CK 和 AST 的值($P<0.05$),这些血清酶指标结果表明芪附汤能够减轻阿霉素引起的心肌损伤。

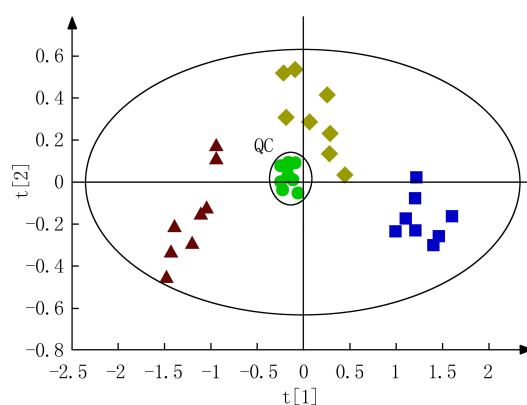


图2 基于 GC-MS 数据集的 PCA 分析的得分图

■:正常组;▲:阿霉素组;◆:芪附汤治疗组;●:QCs

脏毒性生物标志物,结果如图 4 和表 1 所示。

3.4 芪附汤对潜在生物标志物的回调作用

从正常组、阿霉素组、芪附汤治疗组的 PCA 得分图可见(图 2),芪附汤治疗组与正常组、阿霉素组均能分开,但是芪附汤治疗组明显偏离阿霉素组、靠近正常组,表明芪附汤能够整体逆转阿霉素诱导的血清代谢谱改变。由图 5 可见,芪附汤能够明显逆转 17 种代谢物中的 10 种代谢物。

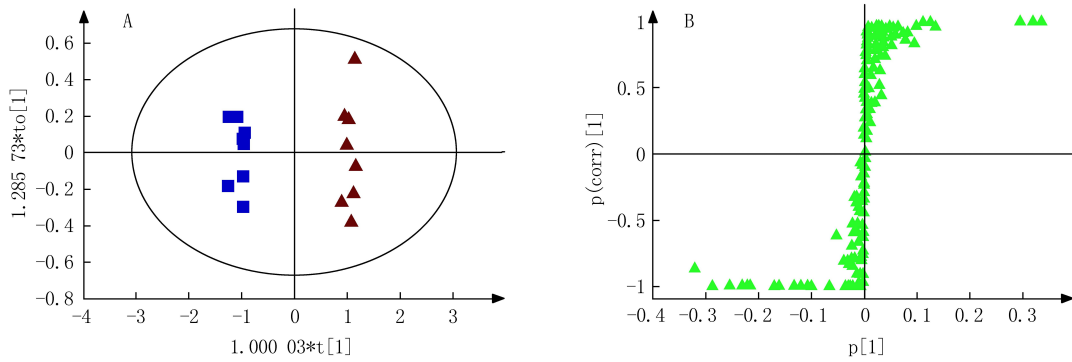


图3 OPLS-DA分析得分图(A)和S-plot载荷图(B)

■:正常组;▲:阿霉素组

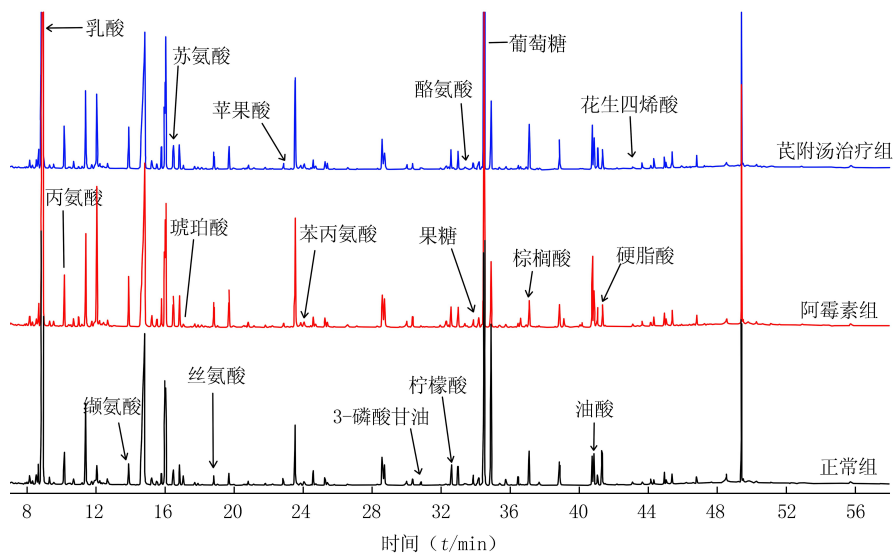


图4 各组大鼠血清样品典型GC-MS总离子流图及主要代谢物

表1 阿霉素组与正常组之间差异代谢物及芪附汤调控趋势

序号	保留时间 (t/min)	代谢物	阿霉素组	芪附汤组
1	8.89	乳酸	↑*	↓#
2	10.14	丙氨酸	↑*	↓#
3	13.88	缬氨酸	↑*	↓#
4	16.46	苏氨酸	↑*	↓#
5	16.82	琥珀酸	↓*	↑#
6	18.82	丝氨酸	↑*	↓#
7	22.85	苹果酸	↓*	↑#
8	24.03	苯丙氨酸	↑*	↓#
9	30.83	3-磷酸甘油	↓*	↑#
10	32.24	柠檬酸	↓*	↑#
11	33.36	酪氨酸	↑*	↓#
12	33.85	果糖	↓*	↑#
13	34.50	葡萄糖	↓*	↑#
14	37.08	棕榈酸	↓*	↑#
15	40.85	油酸	↓*	↑#
16	41.34	硬脂酸	↓*	↑#
17	43.10	花生四烯酸	↑*	↓#

* P<0.05,与正常组比较;# P<0.05,与阿霉素组比较

3.5 芪附汤潜在靶向代谢通路的鉴定

为了鉴定芪附汤抗阿霉素心脏毒性潜在靶向代谢通路,笔者采用 Metaboanalyst 软件对逆转代谢标志物在芪附汤治疗组与阿霉素组的相对峰面积进行代谢通路分析,结果如图6所示,以代谢通路重要性>0.1和统计学分析 P<0.05为靶向通路筛选界值,笔者发现三羧酸循环、二羧酸代谢和花生四烯酸代谢通路是芪附汤主要的靶向代谢通路。其中三羧酸循环、二羧酸代谢是心肌能量代谢的重要途径,花生四烯酸代谢是炎症调控代谢途经。可见,芪附汤可以通过改善心肌能量代谢和炎症效应发挥抗阿霉素心脏毒性的作用。

4 结论

本研究利用 GC-MS 代谢组学技术研究芪附汤对阿霉素心脏毒性血清代谢谱的作用,鉴定了17种阿霉素心脏毒性血清生物标志物,以这些生物标志

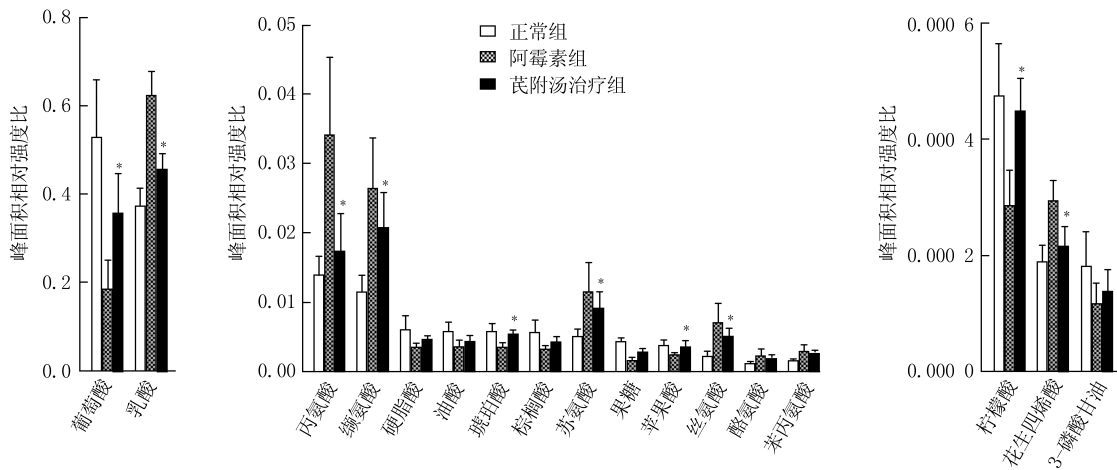


图5 17种生物标志物在正常组、阿霉素组和芪附汤治疗组中的相对强度比较

* $P < 0.05$, 与阿霉素组比较

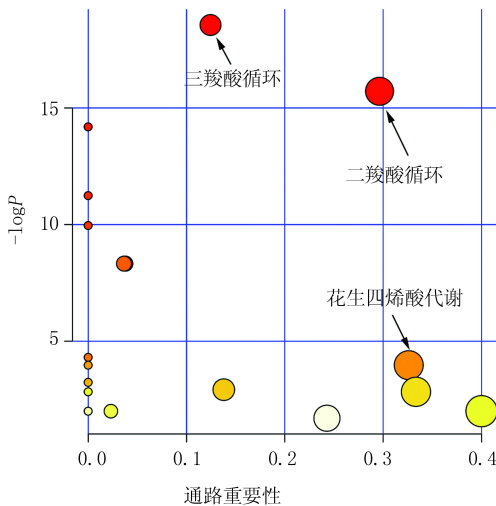


图6 芪附汤治疗组与阿霉素组
差异代谢物的通路分析

物为潜在的药物靶标,发现芪附汤能够明显逆转其中10种代谢物。代谢通路分析显示,三羧酸循环、二羧酸代谢和花生四烯酸代谢通路是芪附汤主要的靶向代谢通路。

【参考文献】

[1] BROWN SA, SANDHU N, HERRMANN J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(12): 718-731.

[2] 于彩娜, 范颖, 林庶茹. 芪附汤对阿霉素心脏毒性损伤的保护作用及其抗氧化机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 193-196.

[3] 于彩娜, 范颖, 林庶茹. 芪附汤抑制阿霉素心脏毒性损伤大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 148-151.

[4] 范颖, 才丽平, 于彩娜, 等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 135-138.

[5] FESSENDEN M. Metabolomics: small molecules, single cells[J]. Nature, 2016, 540(7631): 153-155.

[6] TAN G, LIAO W, DONG X, et al. Metabonomic profiles delineate the effect of Traditional Chinese Medicine decoction on myocardial infarction in rats[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e34157.

[7] SMITH CA, WANT EJ, O MAILLE G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. Anal Chem, 2006, 78(3): 779-787.

[8] XIA J, WISHART DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 55(1): 14.10.1-14.10.91.

[9] GIKA HG, THEODORIDIS GA, WINGATE JE, et al. Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for metabolomic analysis: application to human urine[J]. J Proteome Res, 2007, 6(8): 3291-3303.

[收稿日期] 2018-05-12 [修回日期] 2018-05-28

[本文编辑] 李睿旻