

二至丸抗大鼠肾细胞衰老的 GC-MS 代谢组学研究

徐佳^{1,2,3}, 刘其南³, 翟园园³, 冯丽³, 谢彤^{1,2}, 姚卫峰^{2,3}, 张丽³

(1.江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室,南京中医药大学中医儿科学研究所,江苏 南京 210023;2.南京中医药大学医学代谢组学中心,江苏 南京 210023;3.南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室,江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究 D-半乳糖诱导的衰老大鼠肾细胞(NRK)内源性代谢物的变化,寻找与衰老有关的代谢生物标志物,探讨二至丸对衰老模型的调节作用及其抗衰老的可能机制。方法 采用 D-半乳糖复制 NRK 细胞衰老模型,借助气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,对各组细胞样本进行测定,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验及 Dunn's 多重比较进行单变量统计分析来筛选差异性代谢物。结果 经 PLS-DA 模式识别分析,对照组、模型组和 EZW 组细胞样本能够得到很好的区分,共鉴定出 31 种潜在生物标志物,二至丸含药血清给药后衰老 NRK 细胞胞内的内源性代谢物水平发生不同程度的回调。结论 二至丸可以使 D-半乳糖诱导的衰老 NRK 细胞胞内的异常代谢有所恢复,其治疗作用可能与机体内 31 个代谢物及 10 条相关代谢通路的调节有关。

关键词:衰老;二至丸;细胞代谢组学;GC-MS;大鼠肾细胞;含药血清

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2019)04-0458-07

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0458

引文格式:徐佳,刘其南,翟园园,等.二至丸抗大鼠肾细胞衰老的 GC-MS 代谢组学研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(4):458-464.

Metabolomics Study of Erzhiwan Against Normal Rat Kidney Cell Senescence Based on GC-MS

XU Jia^{1,2,3}, LIU Qi-nan³, ZHAI Yuan-yuan³, FENG Li³, XIE Tong^{1,2}, YAO Wei-feng^{2,3}, ZHANG Li³

(1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Medical Metabolomics Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the changes of endogenous metabolites in senile rat kidney cells (NRK) induced by D-galactose, to find metabolic biomarkers related to aging and to explore the regulation of Erzhiwan on aging model and the anti-aging effect of Erzhiwan. **METHODS** The senescence model was constructed by D-galactose (D-gal). The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique was used to determine the cell samples in each group. Univariate statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis nonparametric test and Dunn's multiple comparison. **RESULTS** PLS-DA pattern recognition analysis showed that the cell samples of the control group, the model group and the EZW group could be well distinguished. A total of 31 potential biomarkers were identified, and the endogenous metabolite levels of the senescent NRK cells were varying degrees of callbacks after the administration of the drug-containing serum. **CONCLUSION** Erzhiwan could restore the abnormal metabolism of D-galactose-induced senescent NRK cells, and its therapeutic effect may be related to the regulation of 31 metabolites and 10 related metabolic pathways.

KEY WORDS: senescence; Erzhiwan; cell metabolomics; GC-MS; normal rat kidney cell; drug-containing serum

收稿日期: 2019-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(85173554);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(YY026);江苏高校青蓝工程中青年学术带头人项目;江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1585)

第一作者: 徐佳,女,硕士研究生,E-mail:njxj0106@126.com

通信作者: 姚卫峰,男,教授,主要从事中药质量控制与代谢研究,E-mail:yaowf@njucm.edu.cn

细胞代谢组学(Cell metabolomics)是代谢组学技术的分支,是一门以细胞为研究对象,考察细胞在受外部刺激下所产生的相对分子质量小于 1 000 的所有内源性代谢物,并同时代谢产物进行定性和定量,从而考察代谢机制的学科^[1]。细胞代谢组学可以直接反映细胞功能(即表型)并监测细胞活性^[2-3],对其内源性代谢物进行非靶向代谢组学或靶向代谢组学的研究可以综合表现细胞内的生化活动状态。然而制约代谢组学发展的其中一个关键科学问题在于如何建立高通量,高灵敏度的方法学平台。气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)优良的定性和定量分析能力,加上其庞大的化合物谱库为鉴定工作带来了很大的便利,使得 GC-MS 在代谢组学研究中显示出突出的优势^[4-5]。

二至丸由酒女贞子、墨旱莲(1:1)二味中药组成,最早出自吴旻辑的《扶寿精方》^[6],具有补腰膝、壮筋骨、强肾阴、乌须发的功效,现代药理作用表明二至丸具有保肝降酶^[7]、抗肝纤维化、抗衰老^[8]、补肾滋阴、抗氧化^[9]等作用。衰老是“肝肾阴虚”的一种临床表现,传统医学认为人体衰老的根本是肾中精气发生了变化,肾精不足、肾虚渐亏是衰老的核心和根本原因^[10]。故本研究选择大鼠肾细胞(NRK)进行衰老造模,借助 GC-MS,结合以 PCA 和 PLS-DA 为主的多变量统计分析手段,通过非靶向代谢组学手段进行分析辨识 D-半乳糖诱导的 NRK 细胞内小分子代谢物的变化,寻找 NRK 细胞衰老的潜在生物标志物,从细胞代谢组学的角度探讨了二至丸抗衰老的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞

大鼠肾(NRK)细胞株,购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂与药材

女贞子(20150701)、墨旱莲(20151020)均购自铜陵禾田中药饮片股份有限公司,由南京中医药大学中医药吴啟南教授鉴定。PBS(Hyclone, AB10111039),高糖 DMEM(Gibco, 8117119); 0.25%胰蛋白酶(Gibco, 1854874);链霉素-青霉素(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清(四季青, 20150915);D-半乳糖(Sigma, WXBC1780V);SOD 试剂盒(南京建成, 20180126);GSH-Px 试剂盒(南京建成, 20180126);MDA 试剂盒(南京建成, 20180126);甲醇(质谱纯,德国 Merck); $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -肉

豆蔻酸、吡啶、*N, O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)、甲氧基胺盐酸盐(美国 Sigma-Aldrich 公司);正己烷(美国 ROE Scientific 公司);娃哈哈纯净水。

1.3 仪器

CO₂ 恒温培养箱, Thermo Forma 3111;超净工作台, 苏净 SW-CJ-2F;倒置显微镜, 日本 Olympus 公司;倒置荧光显微镜, Leica DMi8;微量振荡器涡旋混匀器, HYQ-3110;低速台式离心机 TDL-80-2B, 上海安亭科学仪器厂;电热恒温水浴锅, HH-ZK1;高压灭菌锅, TOMY SX-500;Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司;New Classic MS 型分析天平($d = 0.01$ mg), METTLER TOLEDO;KH-500B 型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司;Tecan Pro200 酶标仪;Trace 1310 气相系统(美国 Thermo);色谱柱: TG-5MS 毛细管色谱柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm);TSQ 8000 质谱仪(Thermo 公司)。

2 方法

2.1 二至丸灌胃溶液的配制

取酒女贞子粗粉 500 g, 加 10 倍 95%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液;滤渣加 10 倍量水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液。合并 2 种滤液用旋转蒸发仪浓缩后, 冷冻干燥, 得酒女贞子复合提取物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取墨旱莲药材 1 000 g, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1 h, 8 层纱布过滤, 合并滤液, 煎煮浓缩, 冷冻干燥, 得墨旱莲水提物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。临用前将酒女贞子复合提取物与墨旱莲水提物按照生药比(1:1)得到二至丸给药实验样品, 以 0.5% CMC-Na 溶液配制成 0.36 g/mL 二至丸灌胃溶液。

2.2 含药血清的制备

取雄性 SD 大鼠 20 只, 普通环境, 自然光照, 自由饮水、普通饲料, 室温(20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 适应性饲养 3 d 后, 按体质量随机分为 2 组:空白组、二至丸组, 每组 10 只。二至丸组按每 100 g 给予 1 mL 二至丸灌胃溶液, 空白组按相同剂量给予生理盐水灌胃, 连续 7 d 给药, 每天早晚各 1 次, 末次给药前 12 h 禁食, 灌胃后 60 min, 10%水合氯醛麻醉, 用真空静脉采血管通过肝门静脉取血 5 mL, 室温静置 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 并将同一组大鼠的血清合并, -80 $^{\circ}\text{C}$ 下分装冻存。临用前 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 然后用 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤。

2.3 细胞培养

NRK 细胞以 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 培养, 生长至 90% 时进行 1:4 传代, 每代均留种冻存。第 6 代生长对数期 NRK 细胞, 调整细胞浓度为 1×10⁵ mL⁻¹, 设对照组、模型组、二至丸含药血清组(EZW)3 组在 6 孔板中实验, 每组设 7 个复孔。对照组加入 2 mL NRK 细胞, 12 h 贴壁后, 换 2 mL 新完全培养基培养 48 h 后, 换 2 mL 完全培养基继续培养 48 h。模型组加入 2 mL NRK 细胞, 12 h 贴壁后, 换含有 20 g/L D-半乳糖完全培养基培养 48 h 后, 换 2 mL 完全培养基继续培养 48 h。EZW 组加入 2 mL NRK 细胞, 12 h 贴壁后, 换含有 20 g/L D-半乳糖完全培养基培养 48 h, 换 2 mL 20% 含药血清培养基继续培养 48 h。

2.4 样品前处理及衍生化反应

取“2.3”项下细胞培养结束后的细胞, 细胞按照如下步骤提取代谢物: 先吸去上清液待用, 每孔快速加入 37 °C, 0.9% NaCl 溶液 2 mL 轻轻冲洗细胞表面 2 遍。吸弃溶液, 每孔加入 4 °C 去离子水 2 mL 快速冲洗细胞表面 2 遍。每组选择其中 1 孔加 300 μL 去离子水, 于冰上, 刮刀刮取细胞, 将刮下细胞转移至 1.5 mL EP 管中, 每孔再加入 100 μL 去离子水反复冲洗后合并到上述 EP 管中。该 EP 管反复冻融 3 次(液氮冷冻, 37 °C 水浴解冻, 各 10 min), 吹打混匀, 定量吸取 20 μL 悬液用于蛋白含量的测定。各组其余 6 孔分别加入 500 μL -80 °C 预冷的含 1, 2-¹³C₂-肉豆蔻酸(10 μg/mL)的甲醇溶液, 同法刮取, 将刮下细胞转移至 1.5 mL EP 管中, 每孔加入 200 μL -80 °C 预冷的含 1, 2-¹³C₂-肉豆蔻酸(10 μg/mL)的甲醇溶液反复冲洗后合并到之前的 EP 管中, 同法破碎。将用于代谢组学的各细胞 4 °C, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于 1.5 mL EP 管中, 30 °C 真空浓缩仪挥干。在已挥干的 EP 管中加 10 mg/mL 甲氧胺吡啶 30 μL, 涡旋 5 min, 30 °C 振荡 1.5 h 后, 继续加入 30 μL BSTFA, 涡旋 5 min, 37 °C 振荡 0.5 h, 最后将样品 4 °C 下, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清进样。

2.5 二至丸干预的细胞 GSH-Px、SOD 活力与 MDA 含量检测

取“2.3”项下细胞培养结束后的上清液, 以 4 °C, 3 500 r/min, 10 min 条件离心处理, 按照试剂盒说明书检测胞外上清液中 GSH-Px、SOD 活力与 MDA 含量。

2.6 GC-MS 分析条件

美国 Thermo 公司 Trace 1310 气相系统, TG-5MS 毛细管色谱柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm), 采用程序升温: 起始温度设为 60 °C, 维持 1 min, 再以 20 °C/min 的速率升温至 320 °C, 维持 5 min。载气为氦气, 流量为 1.2 mL/min, 进样口温度为 300 °C, 采用分流进样, 分流流速为 24.0 mL/min, 分流比为 20:1, 进样量为 1 μL。Thermo 公司 TSQ 8000 质谱仪, 采用电子轰击离子化(EI 电离源), 电子能量为 70 eV, 传输线温度为 300 °C, 离子源温度为 300 °C。质谱采用一级全扫描的采集方式, 起始扫描时间为 3.8 min, 扫描范围为 m/z 50~500。

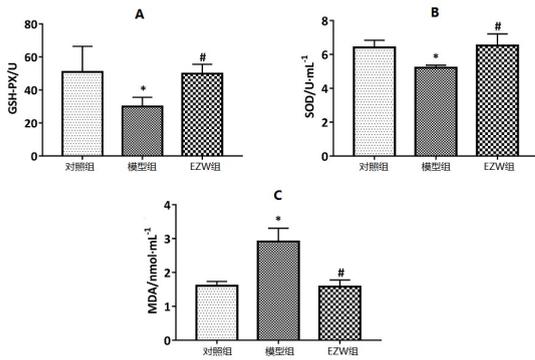
2.7 统计学分析

将 GC-MS 采集的图谱信息, 使用 MS-DIAL 软件^[11]并结合 NIST 数据库进行峰提取和物质鉴定。采用各物质峰高与内标物峰高比值进行数据归一化, 将各组归一化数据根据测得的蛋白浓度, 再进行蛋白归一化。所得数据导入 SIMCA 13.0 软件进行多维统计分析, 采用主成分判别分析(PCA)对数据可靠性进行评价, 并考察各组样品总体分布情况, 以偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)进一步筛选对组间分类贡献大的差异变量, 以 $VIP > 1$ 建立重要代谢差异物列表。采用 Graphpad 软件对筛选到的差异变量在各组中的质谱响应进行 Kruskal-Wallis 非参数检验及 Dunn's 多重比较, 以 $P < 0.05$ 选取具有显著性的差异变量, 寻找有可能反映 NRK 细胞衰老及二至丸治疗 NRK 细胞衰老的潜在生物标志物。借助 MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>)对数据进行聚类分析及代谢通路分析。

3 结果

3.1 各组细胞 GSH-Px、SOD 活力与 MDA 含量检测结果

如图 1 所示, 与空白对照组相比, 模型组的 GSH-Px、SOD 活力显著下降、MDA 含量显著上升, 表明 NRK 细胞衰老模型成功复制。在 20% 含药血清作用下, 相比模型组, EZW 组的 3 个氧化应激指标均有一定的回调, 且具有统计学差异($P < 0.05$), 表明二至丸对 D-半乳糖诱导的衰老 NRK 细胞氧化应激水平有改善作用。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 二至丸对衰老 NRK 细胞的 GSH-Px、SOD 活力与 MDA 含量的影响

3.2 GC-MS 测定结果分析

NRK 细胞样本对照组、模型组与 EZW 组的经典 GC-MS 分析总离子流 (TIC) 图见图 2, 以谱图中最高色谱峰的离子强度为 100%。根据化合物的质荷比、保留时间、保留指数进行化合物的鉴定, 共鉴定出 99 种化合物, 包括氨基酸类、脂肪酸类、糖类等小分子化合物。

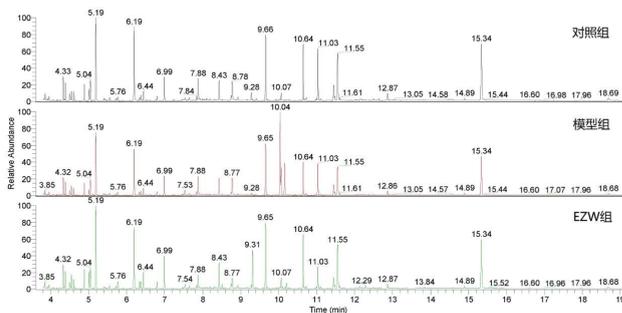


图 2 各组 NRK 细胞样本 GC-MS 总离子流图

3.3 代谢轮廓分析

将对照组、模型组、EZQ 组、质控样本组 (QC) 的 GC-MS 数据经预处理后导入 SIMCA 13.0 软件进行无监督的主成分分析 (PCA), 所得模型参数为: $R^2 X = 0.862$, $Q^2 = 0.759$ 。由 PCA 得分图 (图 3A) 可以看出, QC 样本均聚集良好, 说明分析方法可靠, 重现性强。为直观反映二至丸对 NRK 细胞的调节作用, 去除 QC 样本, 进行 PLS-DA 分析, 所得模型参数为: $R^2 X = 0.699$, $R^2 Y = 0.99$, $Q^2 = 0.958$ 。 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 及 Q^2 为模型质量评价参数, 其中 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 为拟合优度, 反映模型的解释率, Q^2 为交叉验证参数, 描述模型的累积预测程度, 代表了模型的预测能力^[12]。本研究建立的模型具有较好的区分度及预测率。由 PLS-DA 二维得分图 (图 3B) 可以看出, 对照组与模型组之间能明显区分, 提示对照组细

胞与 D-半乳糖致衰老的细胞内代谢物存在明显的差异, 给药组与模型组明显区分且向对照组靠近, 提示二至丸对衰老 NRK 细胞内代谢具有一定程度的调节作用。

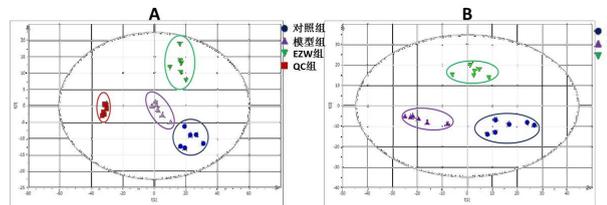


图 3 各组细胞样本的 GC-MS 分析 PCA (A) 及 PLS-DA (B) 得分图

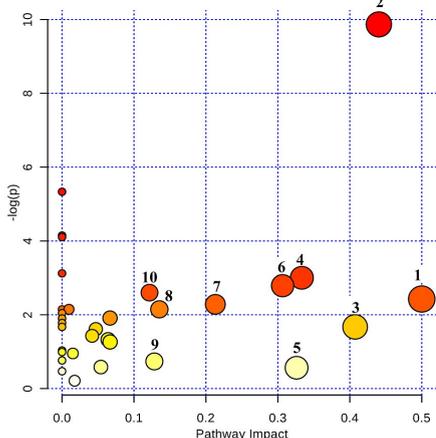
3.4 差异代谢物的鉴定

根据对照组、模型组、EZW 组构建的 PLS-DA 模型的 VIP 值及其置信区间, 筛选出 $VIP > 1$ 的差异变量。对筛选到的差异变量在对照组、模型组、给药组 3 组中的变化进行 Kruskal-Wallis 非参数检验及 Dunn's 多重比较, 选取 Kruskal-Wallis 非参数检验结果 $P < 0.05$ 且 Dunn's 多重比较对照组与模型组调整 $P < 0.05$ 的变量作为差异显著性变量。筛选出对模型组与对照组分类贡献最大且具有统计学差异的化合物, 共鉴定出 31 个, 结果见表 1。相对对照组, 模型组胞内 L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-脯氨酸、L-别苏氨酸、柠檬酸、肌醇、 α -酮戊二酸、D-蔗糖醇、L-苯丙氨酸、O-磷酸丝氨酸、肌氨酸、对羟基苯甲酸、花生四烯酸、L-半胱氨酸、腺嘌呤、蔗糖酸、苹果酸、3-磷酸甘油酸、胆固醇、1-棕榈酸单甘油酯、3-磷酸甘油、甘油、3-(2-羟苯基) 丙酸、鸟苷酸、磷酸酯、羟基丙酮酸、1-甲基腺苷、乙醇胺磷酸酯、羟基乙酸、尿嘧啶的含量均显著下降, D-葡萄糖-6-磷酸的含量显著上升, 提示胞内中这 31 种内源性代谢物可能是 D-半乳糖诱导的 NRK 细胞衰老的潜在标志物。

3.5 代谢通路分析

采用 MetaboAnalyst 通路分析工具, 对鉴别出的潜在生物标志物进行通路富集分析和通路拓扑分析, 以 $P < 0.05$, 通路影响值大于 0.1 的通路, 作为潜在的靶向途径^[13], 图 4 为 MetPA 平台通路分析的总结图, 匹配到的代谢通路由图中圆圈表示, 图中圆圈的颜色和大小由代谢通路的 P 值和通路重要性值决定, 包括苯丙氨酸, 酪氨酸和色氨酸的生物合成、甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、花生四烯酸代谢、甘油酯代谢、丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢、肌醇磷酸酯代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、柠檬酸循环 (TCA 循环) 10

条通路,由通路分析的结果可以看出,这些通路可能与 D-半乳糖诱导的 NRK 细胞衰老以及二至丸抗 NRK 细胞衰老通路最为相关。



注:1.苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸的生物合成;2.甘氨酸,丝氨酸和苏氨酸代谢;3.苯丙氨酸代谢;4.乙醛酸和二羧酸代谢;5.花生四烯酸代谢;6.甘油酯代谢;7.丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢;8.肌醇磷酸酯代谢;9.半胱氨酸和蛋氨酸代谢;10.柠檬酸循环(TCA 循环)

图 4 通过 MetPA 得到的通路分析概要图

花生四烯酸主要以磷脂的形式存在于细胞膜上,肌醇是 B 族维生素中的一种亲脂肪型、水溶性维生素^[14],两者都是合成磷酸甘油酯的重要原料,对构成生物膜的磷脂双分子层形成有重要作用。与对照组相比,模型组中花生四烯酸、肌醇含量显著下降,提示细胞衰老可能是由于细胞膜受到破坏,诱导花生四烯酸代谢等炎症反应,从而诱发衰老。给予二至丸含药血清后,花生四烯酸有所回调,推测二至丸对衰老 NRK 细胞的保护作用,可能与二至丸保护细胞膜结构的完整性相关。

研究表明,肾功能下降和氨基酸代谢紊乱是衰老的主要特征^[15]。其中,L-苯丙氨酸具有生理活性的芳香族氨基酸,能去除氧自由基和改善内皮细胞的内分泌^[16]。L-谷氨酰胺是体内含量最高的必需

氨基酸,少量 L-谷氨酰胺会被肾小管细胞利用作为能源物质^[17]。L-半胱氨酸、甘氨酸可与谷氨酸生成具有抗氧化作用和整合解毒作用的谷胱甘肽,清除体内自由基。与对照组相比,在 D-半乳糖诱导的模型组中的 L-苯丙氨酸、L-谷氨酰胺、L-半胱氨酸、甘氨酸、 α -酮戊二酸含量均下降,表明 D-半乳糖诱导的衰老可能是形成活性氧(ROS),氧化应激途径诱导的 NRK 细胞衰老,给药后均发生显著性回调。推测二至丸抗衰老的作用可能与抗氧自由基相关,通过清除自由基,降低其带来的损伤,从而实现抗衰老。

此外 D-半乳糖诱导衰老后还引起了体内能量代谢的紊乱,能量代谢与衰老的发生直接相关^[18-19]。其中三羧酸循环和糖酵解是能量代谢的主要代谢途径。谷氨酸谷氨酸脱氢酶的作用下生成 α -酮戊二酸,也可以在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢中转化为琥珀酸^[20],产生的代谢物均可进入三羧酸循环为机体提供能量。磷酸丝氨酸可经磷酸丝氨酸磷酸酶生成丝氨酸,丝氨酸也会发生转氨作用而形成羟基丙酮酸,进一步转变为葡萄糖或进入糖酵解,进行能量供应^[21]。甘油三酯彻底水解可产生甘油、脂肪酸,甘油经一系列转化生成 3-磷酸甘油酸,进入糖酵解,最后生成丙酮酸进入线粒体生成乙酰辅酶 A 参与三羧酸循环。研究发现羟基乙酸可经 L-氨基酸氧化酶生成乙醛酸^[22],乙醛酸可经乙醛酸脱氢酶(酰化)生成乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环,最终分解成 H₂O 与 CO₂,释放能量。在模型组中检测到 3-磷酸甘油酸、羟基丙酮酸、甘油的含量较对照组降低,提示在衰老的 NRK 细胞内,糖代谢发生紊乱,能量供应出现异常。而给予二至丸含药血清后,3-磷酸甘油酸、羟基丙酮酸、甘油含量均能回调,表明二至丸可以调整衰老细胞的异常糖代谢,增加细胞的能量供应,从而促使细胞抗衰老。

表 1 NRK 细胞中潜在生物标记物

| 分子式 | 英文名称 | 中文名称 | VIP | P | 模型组 vs. 对照组 | | | EZW 组 vs. 模型组 | | |
|--------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|------|----------|-------------|------|------------------|---------------|------|------------------|
| | | | | | Trend | FC | Adjusted P-value | Trend | FC | Adjusted P-value |
| C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | L-Glutamine | L-谷氨酰胺 | 1.53 | 3.50E-07 | ↓* | 0.55 | 0.044 9 | ↑# | 2.29 | 0.000 3 |
| C ₂ H ₅ NO ₂ | Glycine | 甘氨酸 ^S | 1.52 | 3.50E-07 | ↓* | 0.78 | 0.044 9 | ↑## | 2.49 | 0.000 3 |
| C ₅ H ₉ NO ₂ | L-Proline | L-脯氨酸 ^S | 1.50 | 3.50E-07 | ↓* | 0.87 | 0.017 5 | ↑## | 1.90 | 0.000 3 |
| C ₄ H ₉ NO ₃ | L-Allothreonine | L-别苏氨酸 | 1.50 | 1.05E-06 | ↓* | 0.82 | 0.044 9 | ↑## | 1.81 | 0.000 4 |
| C ₆ H ₈ O ₇ | Citric acid | 柠檬酸 ^S | 1.49 | 3.50E-07 | ↓* | 0.53 | 0.017 5 | ↑## | 4.76 | 0.000 3 |
| C ₆ H ₁₂ O ₆ | Myo-Inositol | 肌醇 | 1.48 | 3.50E-07 | ↓* | 0.75 | 0.033 1 | ↓ | 0.63 | 0.154 7 |

(续表)

| 分子式 | 英文名称 | 中文名称 | VIP | P | 模型组 vs. 对照组 | | | EZW 组 vs. 模型组 | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------|----------|-------------|------|------------------|---------------|-------|------------------|
| | | | | | Trend | FC | Adjusted P-value | Trend | FC | Adjusted P-value |
| C ₅ H ₆ O ₅ | Oxoglutaric acid | α -酮戊二酸 ^S | 1.48 | 3.50E-07 | ↓ ** | 0.48 | 0.000 6 | ↑ ## | 3.58 | 0.000 3 |
| C ₄ H ₁₀ O ₄ | D-Threitol | D-苏糖醇 | 1.48 | 3.50E-07 | ↓ ** | 0.22 | 0.000 6 | ↑ ## | 10.42 | 0.000 3 |
| C ₉ H ₁₁ NO ₂ | L-Phenylalanine | L-苯丙氨酸 ^S | 1.47 | 4.90E-06 | ↓ * | 0.77 | 0.044 9 | ↑ ## | 3.94 | 0.000 6 |
| C ₃ H ₈ NO ₆ P | Phosphoserine | 磷酸丝氨酸 | 1.44 | 3.50E-07 | ↓ * | 0.48 | 0.033 1 | ↓ | 0.49 | 0.154 7 |
| C ₃ H ₇ NO ₂ | Sarcosine | 肌氨酸 | 1.44 | 3.50E-07 | ↓ * | 0.83 | 0.024 2 | ↑ ## | 1.87 | 0.000 3 |
| C ₇ H ₆ O ₃ | 4-Hydroxybenzoic acid | 对羟基苯甲酸 | 1.42 | 7.00E-07 | ↓ * | 0.53 | 0.014 8 | ↓ | 0.67 | 0.174 9 |
| C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | Arachidonic acid | 花生四烯酸 | 1.40 | 1.05E-06 | ↓ * | 0.74 | 0.024 2 | ↑ ## | 2.25 | 0.000 4 |
| C ₆ H ₁₃ O ₉ P | Glucose 6-phosphate | D-葡萄糖-6-磷酸 ^S | 1.40 | 3.50E-07 | ↑ ** | 1.63 | 0.002 9 | ↓ ## | 0.39 | 0.000 3 |
| C ₃ H ₇ NO ₂ S | L-Cysteine | L-半胱氨酸 | 1.39 | 3.50E-07 | ↓ * | 0.50 | 0.017 5 | ↑ ## | 3.98 | 0.000 3 |
| C ₅ H ₅ N ₅ | Adenine | 腺嘌呤 | 1.37 | 1.05E-06 | ↓ * | 0.61 | 0.017 5 | ↑ ## | 2.04 | 0.000 4 |
| C ₄ H ₈ O ₅ | Threonic acid | 苏糖酸 | 1.31 | 4.90E-06 | ↓ * | 0.67 | 0.014 8 | ↑ ## | 1.77 | 0.000 6 |
| C ₄ H ₆ O ₅ | Malic acid | 苹果酸 ^S | 1.30 | 4.88E-04 | ↓ ** | 0.55 | 0.007 4 | ↑ # | 1.82 | 0.014 8 |
| C ₃ H ₇ O ₇ P | 3-Phosphoglyceric acid | 3-磷酸甘油酸 | 1.29 | 1.12E-04 | ↓ * | 0.41 | 0.044 9 | ↑ ## | 2.72 | 0.002 0 |
| C ₂₇ H ₄₆ O | Cholesterol | 胆固醇 | 1.29 | 1.12E-04 | ↓ * | 0.74 | 0.044 9 | ↑ ## | 1.40 | 0.002 0 |
| C ₁₉ H ₃₈ O ₄ | 1-Monopalmitin | 1-棕榈酸单甘油酯 | 1.27 | 1.82E-05 | ↓ * | 0.83 | 0.007 4 | ↑ ## | 1.37 | 0.000 9 |
| C ₃ H ₉ O ₆ P | Glycerol 3-phosphate | 3-磷酸甘油 | 1.21 | 3.50E-07 | ↓ ** | 0.29 | 0.000 3 | ↑ | 1.82 | 0.154 7 |
| C ₃ H ₈ O ₃ | Glycerol | 甘油 | 1.21 | 7.73E-05 | ↓ * | 0.72 | 0.044 9 | ↑ ## | 1.52 | 0.001 6 |
| C ₉ H ₁₀ O ₃ | 3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid | 3-(2-羟苯基)丙酸 | 1.18 | 1.12E-04 | ↓ * | 0.84 | 0.044 9 | ↑ ## | 1.26 | 0.002 0 |
| C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P | Guanosine monophosphate | 鸟苷酸 | 1.13 | 1.12E-04 | ↓ * | 0.49 | 0.044 9 | ↑ ## | 2.59 | 0.002 0 |
| CH ₅ O ₄ P | Phosphate | 磷酸酯 | 1.11 | 2.10E-04 | ↓ ** | 0.76 | 0.002 9 | ↑ # | 1.26 | 0.033 1 |
| C ₃ H ₄ O ₄ | Hydroxypyruvic acid | 羟基丙酮酸 | 1.10 | 4.88E-04 | ↓ * | 0.79 | 0.014 8 | ↑ ## | 1.27 | 0.007 4 |
| C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄ | 1-Methyladenosine | 1-甲基腺苷 | 1.05 | 4.50E-04 | ↓ ** | 0.78 | 0.006 2 | ↑ # | 1.26 | 0.017 5 |
| C ₂ H ₈ NO ₄ P | O-Phosphoethanolamine | 乙醇胺磷酸酯 | 1.01 | 6.47E-05 | ↓ ** | 0.66 | 0.001 3 | ↑ | 1.28 | 0.091 6 |
| C ₂ H ₄ O ₃ | Glycolic acid | 羟基乙酸 | 1.01 | 4.50E-04 | ↓ ** | 0.76 | 0.006 2 | ↑ # | 1.25 | 0.017 5 |
| C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ | Uracil | 尿嘧啶 | 1.00 | 3.18E-04 | ↓ ** | 0.67 | 0.004 3 | ↑ # | 1.45 | 0.024 2 |

注:s:由标准品鉴定;与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;↑升高,↓降低;FC:Fold Change,变化倍数,为两组 NRK 细胞中代谢物质谱响应平均值之比。 P -values 为 Kruskal-Wallis 非参数检验结果,adjusted P -values 为 Dunns 多重比较结果。

4 讨论

本研究采用基于 GC-MS 的非靶向代谢组学技术,初步讨论了二至丸对衰老模型的调节作用及二至丸抗衰老的可能机制。迄今为止,对 D-半乳糖诱导衰老的造模机制尚不完全清楚,但有两种主流观点^[23],一种观点是:D-半乳糖在半乳糖氧化酶的作用下生成乙醛和过氧化氢,增多 ROS,使脂质过氧化,产生超氧自由基,进而导致衰老;另一种观点是:过量的 D-半乳糖在醛糖还原酶的催化下还原成半乳糖醇,后者不能被细胞进一步代谢而堆积在细胞内,影响正常渗透压,导致细胞肿胀和功能障碍,最终引起衰老。在本实验中,两种观点均有体现,在模型组,花生四烯酸、肌醇的含量下降,表明细胞膜受损,

可能由半乳糖醇的堆积造成的渗透压变化引起的。L-谷氨酰胺、L-半胱氨酸、甘氨酸含量降低,表明胞内存在过量自由基,破坏了细胞的氧化-抗氧化平衡。在检测到的显著性差异代谢物中,D-葡萄糖-6-磷酸的含量在模型组中升高,表明 D-半乳糖进入细胞进行糖酵解,但是 3-磷酸甘油酸含量却下降,表明在糖酵解的过程中的酶可能受到了自由基的攻击而活性降低,使得能量代谢紊乱,导致细胞衰老。二至丸作用后,差异性代谢物均得到了回调,从而延缓了细胞衰老,为二至丸对抗衰老的作用机制提供细胞代谢组学方面的依据。

参考文献:

[1] NICHOLSON J, LINDON J, HOLMES E. Metabonomics: understanding the metabolic response of living systems to patho-

- physiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [2] FEI F, BOWDISH D, MCCARRY B. Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS [J]. *Analytic Bioanalytical Chem*, 2014, 406(15): 3723-3733.
- [3] 徐佳, 刘其南, 翟园园, 等. 细胞代谢组学样品前处理研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(3): 418-425.
- [4] 黄强, 尹沛源, 路鑫, 等. 色谱-质谱联用技术在代谢组学中的应用 [J]. *色谱*, 2009, 27(5): 566-572.
- [5] 周佳, 王霜原, 常玉玮, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术的水稻代谢轮廓分析方法的建立 [J]. *色谱*, 2012, 30(10): 1037-1042.
- [6] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 272-275.
- [7] 王莉英. 二至丸的保肝降酶作用研究 [J]. *海峡药学*, 2002, 14(1): 14-15.
- [8] 刘其南, 徐佳, 翟园园, 等. 二至丸对 D-半乳糖诱导大鼠肾细胞衰老的保护作用 [J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(1): 81-86.
- [9] 薛娣, 王卫娜. 二至丸对老年痴呆小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2010, 9(20): 1550-1551.
- [10] 刘梦云, 韩旭. 肾虚与衰老机理中西医研究概况 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(11): 108-111.
- [11] TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. *Nat Meth*, 2015, 12(6): 523-526.
- [12] 孙玲伟, 包凯, 李影, 等. 奶牛临床和亚临床酮病的血浆代谢组学研究 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(8): 1588-1599.
- [13] 袁子文, 钟立甲, 纪鹏, 等. 当归干预血瘀证大鼠血浆代谢组学

- 研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(4): 559-567.
- [14] 张泽生, 梁辰, 刁琢, 等. 肌醇与 D-手性肌醇抗氧化作用的研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2015(5): 110-113.
- [15] SUN J, JIAO C, MA Y, et al. Anti-ageing effect of red ginseng revealed by urinary metabolomics using RRCL-Q-TOF-MS [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29(4): 387-397.
- [16] 车在前, 范春玲, 顾天华, 等. L-苯丙氨酸对自发性高血压大鼠血液 NO、ET 和 SOD 水平的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(2): 389-390.
- [17] 滕光寿. L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤的防护效应 [D]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [18] UNGVARI Z, BAILEY-DOWNS L, GAUTAM T, et al. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate macaca mulatta [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66(8): 866-875.
- [19] HARAMIZU S, OTA N, HASE T, et al. Aging-associated changes in physical performance and energy metabolism in the senescence-accelerated mouse [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66(6): 646-655.
- [20] 高梅梅. 阿尔茨海默病及轻度认知功能障碍患者血清代谢组学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [21] 尚雨嫣. 基于代谢组学的四君子汤、四物汤、八珍汤对 14 月龄雌性小鼠的作用 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [22] 谷劲松, 徐霞, 宋欣. 乳酸氧化酶研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(5): 36-41.
- [23] 雷鸣, 朱祖健. D-半乳糖致衰老的研究进展 [J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(1): 83-85.

(编辑: 董宇)

(上接 383 页)滋心阴, 也要注意调心, 宁心, 使得其心理健康, 增强信心度过此段艰难时期。并且事实证明, 心理素质较佳, 心情开朗的患者明显较情怀忧郁的远期生存率高得多。

4 验案举例

患者孙某, 女性, 29 岁, 2016 年 8 月 5 日初诊。主诉: 左乳癌术后 2 月伴潮热汗出烦躁不适 1 月。病史: 患者 2 月前行左乳癌改良根治术, 术后病理: 浸润性导管癌, ER(-)PR(-)Her-2(-)Ki-67(20%)腋窝淋巴结见癌转移, 术后行表阿霉素联合环磷酰胺方案后出现潮热, 多汗, 易心烦及急躁, 失眠, 对治疗丧失信心, 阴道分泌物减少, 舌边尖红, 苔薄白, 脉弦细。辨证: 心肝气火偏旺, 肝肾不足。治拟宁心疏肝, 滋补肾阴。处方: 钩藤 15 g, 黄连 3 g, 紫贝齿 10 g, 龙齿 10 g, 淮山药 10 g, 山茱萸 10 g, 熟地黄 10 g, 当归 10 g, 地骨皮 10 g, 白芍 10 g, 五味子 10 g, 石决明 15 g, 鳖甲 15 g, 龟甲 15 g, 浮小麦 30 g。14 剂, 每日 1 剂, 煎服, 每日 2 次。

8 月 25 日二诊。诸症状均有好转, 化疗后肝功能轻度异常, 原方去石决明及山茱萸, 加垂盆草 30 g, 酸枣仁 15 g, 远志 10 g。14 剂, 每日 1 剂, 煎服。

9 月 10 日三诊。患者诉潮热、汗出、心情烦躁

明显好转, 失眠改善, 阴道分泌物增加, 继续上方加减调理。

按: 该患者年轻女性, 化疗后出现卵巢功能抑制, 结合四诊, 当属心肝气火偏旺, 肝肾不足, 治疗的重点就是宁心滋肾。宁心使其心理强健, 增强信心度过此段艰难的时期。《慎斋遗书》云: “欲补心者须实肾, 使肾得升; 欲补肾者须宁心, 使心得降”^[7]。火动阴伤, 静则火降, 火降则阴复。笔者在临床中观察到年轻乳腺癌患者经卵巢抑制后出现的症状与心肝火旺、肾阴不足的绝经前后诸证非常类似, 经过使用夏桂成教授的清心滋肾汤加减来治疗, 取效甚殊。

参考文献:

- [1] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国早期乳腺癌卵巢功能抑制临床应用专家共识 (2018 年版) [J]. *中国癌症杂志*, 2018, 28(11): 871-880.
- [2] 邱琳. 卵巢功能抑制在早期乳腺癌中生存分析 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [3] 沈金鳌. 谈金鳌医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 125.
- [4] 胡荣魁, 谈勇. 从清心滋肾汤浅析夏桂成治疗更年期综合征的临床经验 [J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(4): 373-375.
- [5] 夏桂成, 谈勇, 赵可宁. 妇科方药临证心得十五讲 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 211-222.
- [6] 唐容川. 唐容川医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 74.
- [7] 周子干. 慎斋遗书 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1987: 9.

(编辑: 叶亮)