

# 银杏黄酮苷元减轻多柔比星心脏毒性的作用机制<sup>△</sup>

蔡英<sup>1,2\*</sup>, 钱丽<sup>2</sup>, 王开靓<sup>1,2</sup>, 李琴<sup>3</sup>, 刘春花<sup>4</sup>, 孙佳<sup>1</sup>, 潘洁<sup>4</sup>, 李勇军<sup>2,4</sup>, 陆苑<sup>1,3#</sup> (1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 遵义医科大学基础药理教育部重点实验室, 贵州遵义 563006; 4. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)06-0659-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.06.04



**摘要** 目的 探究银杏黄酮苷元(GA)减轻多柔比星(DOX)心脏毒性的潜在作用机制。方法 将雄性ICR小鼠随机分为对照组(CON组)、模型组(DOX组)和GA+DOX组(GDOX组),每组12只。DOX组小鼠隔天尾静脉注射DOX药液3 mg/kg, GDOX组小鼠每天灌胃GA混悬液100 mg/kg+隔天尾静脉注射DOX药液3 mg/kg,连续15 d。给药结束后,检测各组小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)水平。基于代谢组学方法,采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱串联质谱技术,在主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)的基础上,以变量重要性投影值 $\geq 1$ 、峰面积差异倍数 $> 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准筛选差异代谢物(DEMs),并基于HMDB、PubChem等数据库进行生物学分析。结果 与CON组比较,DOX组小鼠血清中AST、CK、CK-MB、LDH水平均显著升高( $P < 0.05$ );与DOX组比较,GDOX组小鼠血清中上述指标(CK-MB除外)水平均显著降低( $P < 0.05$ )。PCA、OPLS-DA结果均显示,CON组、DOX组、GDOX组小鼠心脏组织样品均能完全分离。经数据库匹配后,鉴定出37个共有DEMs,其中DOX组显著上调而GDOX组显著下调的DEMs有17个,DOX组显著下调而GDOX组显著上调的DEMs有8个;涉及通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢,关键代谢物包括二十二碳六烯酸、花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)和牛磺酸。结论 GA可能通过作用于二十二碳六烯酸、花生四烯酸等关键代谢物来调节不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢等代谢途径,进而减轻DOX的心脏毒性。**关键词** 银杏黄酮苷元;多柔比星;心脏毒性;代谢组学

## Mechanism of ginkgo flavonoid aglycone against doxorubicin-induced cardiotoxicity

CAI Ying<sup>1,2</sup>, QIAN Li<sup>2</sup>, WANG Kailiang<sup>1,2</sup>, LI Qin<sup>3</sup>, LIU Chunhua<sup>4</sup>, SUN Jia<sup>1</sup>, PAN Jie<sup>4</sup>, LI Yongjun<sup>2,4</sup>, LU Yuan<sup>1,3</sup>

[1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics & State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563006, China; 4. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

**ABSTRACT OBJECTIVE** To investigate the potential mechanism of the effect of ginkgo flavone aglycone (GA) against doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity. **METHODS** The male ICR mice were randomized into control group (CON group), model group (DOX group) and GA+DOX group (GDOX group), with 12 mice in each group. The DOX group was injected with DOX solution at a dose of 3 mg/kg via tail vein every other day, and the GDOX group was given GA suspension intragastrically at a dose of 100 mg/kg every day+DOX solution at a dose of 3 mg/kg via tail vein every other day, for 15 consecutive days. After the end of administration, the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in mice were detected in each group. Based on the metabolomics method, UHPLC-Q-

Exactive Orbitrap HRMS method was used; based on principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), the differentially expressed metabolites (DEMs) were screened using the criteria of variable importance in the projection  $\geq 1$ , fold change of peak area  $> 1$  and  $P < 0.05$ ; biological analysis was conducted based on databases such as HMDB and PubChem. **RESULTS** Compared with CON group, serum levels of AST, CK, CK-

**△ 基金项目** 国家自然科学基金委-贵州喀斯特中心项目 (No. U1812403-5); 贵州省科技计划项目 (No. 黔科合基础-ZK[2022]一般374, No. 黔科合基础[2020]1Y381); 贵州省基础药理教育部重点实验室开放课题基金资助项目 (No. 黔教合KY字[2022]395号)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: 3260638059@qq.com

# 通信作者 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础。电话: 0851-86908648。E-mail: luyuan@gmc.edu.cn

MB and LDH were increased significantly in DOX group ( $P<0.05$ ); compared with DOX group, the serum levels of the above indicators (except for CK-MB) were decreased significantly in GDOX group ( $P<0.05$ ). PCA and OPLS-DA showed that myocardial tissue samples of CON group, DOX group and GDOX group were isolated completely. After database matching, 37 common DEMs were identified, among which 17 DEMs were significantly up-regulated in the DOX group and significantly down-regulated in the GDOX group, and 8 DEMs were significantly down-regulated in the DOX group and significantly up-regulated in the GDOX group; pathway enrichment involved the biosynthesis of unsaturated fatty acids, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, taurine and hypotaurine metabolism; the key metabolites in the above pathways included docosahexaenoic acid, arachidonic acid, phosphatidylcholine (16:0/18:3) and taurine. **CONCLUSIONS** GA may regulate the biosynthesis of unsaturated fatty acids, arachidonic acid metabolism and other metabolic pathways by acting on the core metabolites such as docosahexaenoic acid and arachidonic acid, thus alleviating the cardiotoxic effects of DOX.

**KEYWORDS** ginkgo flavonoid aglycone; doxorubicin; cardiotoxicity; metabolomics

多柔比星(doxorubicin, DOX)又称阿霉素,是一种具有抗肿瘤活性的蒽环类抗生素,抗癌谱较广,能抑制肿瘤细胞RNA和DNA的合成,可用于恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、膀胱癌等的临床治疗<sup>[1]</sup>。然而临床实践显示,DOX具有心脏毒性、骨髓造血功能障碍等毒副作用,且以心脏毒性最为显著,严重时会引起心力衰竭(heart failure, HF)。研究指出,蒽环类药物的心脏毒性与药物累积剂量密切相关:当累积剂量为400 mg/m<sup>2</sup>时, HF的发生风险为3%~5%;当累积剂量为550 mg/m<sup>2</sup>时, HF的发生风险可达7%~26%,严重影响患者预后<sup>[2]</sup>。因此,降低蒽环类药物的心脏毒性、开发更安全高效的保护剂具有重要临床意义。

银杏黄酮苷元(ginkgo flavone aglycone, GA)是一种银杏黄酮苷类提取物,可通过酶水解法获取,主要包括槲皮素、山柰酚和异鼠李素等成分。研究表明,上述成分均具有抗肿瘤、抗氧化和保护心脑血管系统等多种药理活性<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期体内、体外实验初步证实,GA对DOX具有“增效减毒”作用,并可明显减轻DOX的心脏毒性<sup>[5]</sup>,但相关机制尚不清楚。

代谢组学(metabolomics)可反映生物体内所有小分子(分子量<1 000 Da)物质在外界干预或病理条件下的动态变化规律,进而有助于阐释药物代谢物与疾病之间的调控关系<sup>[6]</sup>。因该技术能全面监测内源性代谢物的变化,并将代谢紊乱与生物表型变化相互关联,与中药多成分、多靶点的治疗特征相符,故被广泛应用于中医药研究领域<sup>[7]</sup>。基于此,在初步证实GA能显著减轻DOX心脏毒性这一作用的基础上,本研究拟采用具有扫描范围广、灵敏度和分辨率高、专属性强等优点的超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱串联质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS,以下简称“UHPLC-MS/MS”)技术检测小鼠心脏组织的代谢物,筛选差异代谢物(differentially expressed metabolites, DEMs)并分析相关代谢通路,以期阐明GA减轻DOX心脏毒性的可能机制,为GA的开发应用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括配备Q Exactive Plus型高分辨质谱仪的Vanquish型UHPLC系统、Forma 905-ULTS1490型医用低温冰箱、Variskan Lux型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), ALLEGRA X-30R型离心机(美国Beckman Coulter公司), 6KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

盐酸多柔比星原料药(批号NO625A,纯度>98%)购自大连美仑生物科技有限公司;GA(槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量分别为47.28%、43.42%、1.93%)由贵州省生化工程中心何珺副教授惠赠;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自北京索莱宝科技有限公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)试剂检测盒(批号分别为20210708、20210722、20210710、20210709)均购自南京建成生物工程研究所;甲醇、乙腈为质谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠,体重18~22 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2022-0011。所有动物均饲养于温度18~25℃、相对湿度50%~70%的环境中,适应性饲养1周后进行实验。本研究严格遵循动物实验的相关要求及规则,具体实验方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会审核批准(编号2101200)。

## 2 方法

### 2.1 药效学研究

将小鼠随机分为对照组(CON组)、模型组(DOX组)、GA+DOX组(GDOX组),每组12只。根据前期研究<sup>[5]</sup>, CON组小鼠尾静脉注射生理盐水0.25 mL,隔天1次;DOX组小鼠尾静脉注射DOX药液(以生理盐水为溶剂)3 mg/kg,隔天1次,累积剂量为21 mg/kg;GDOX组

小鼠灌胃 GA 混悬液(以 0.5%CMC-Na 溶液为溶剂)100 mg/kg,每天 1 次+尾静脉注射 DOX 药液 3 mg/kg,隔天 1 次,连续 15 d。给药期间,隔天监测各组小鼠的体重变化,观察其精神状态和饮食量,并绘制体重变化曲线。末次给药后 2 h,各组小鼠摘眼球取血,于室温下静置 30 min 后,于 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 15 min,收集上层血清,于 -80 °C 保存。随机选取各组 6 只小鼠的血清样品,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用多功能酶标仪检测其中 AST、CK、CK-MB、LDH 水平,再次验证模型是否复制成功并评价 GA 的干预效果。

## 2.2 代谢组学分析

### 2.2.1 心脏组织代谢物提取及样品处理

(1)心脏组织样品采集:取血后,各组小鼠脱颈椎处死,立即取下心脏,用提前预冷的生理盐水冲洗干净,再以液氮速冻后,转移至 -80 °C 冰箱中保存,备用。

(2)极性成分提取:临用前,将心脏组织于 4 °C 下解冻,冰上剪碎后,称取样品 50 mg 置于 2 mL EP 管中,加入预冷的 50% 甲醇 1.5 mL,于冰浴中匀浆,制备组织匀浆液。取该组织匀浆液,于 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,以氮气流吹干,即得极性成分,于 -80 °C 下保存,备测。

(3)非极性成分提取:取上述极性成分提取离心时所得残渣,加入预冷的二氯甲烷-甲醇混合溶液(体积比 3:1)1.5 mL 重悬,于冰浴中匀浆,制备组织匀浆液。取该组织匀浆液,于 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,以氮气流吹干,即得非极性成分,于 -80 °C 下保存,备测。

(4)样品处理:进样分析前,取上述极性、非极性成分样品分别用 50% 甲醇 120  $\mu$ L 复溶,以 12 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,合并混匀,即得单只小鼠待测样品,备测。

### 2.2.2 UHPLC-MS/MS 分析条件

色谱条件如下:以 Hypersil Gold(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9  $\mu$ m)为色谱柱,以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A、0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相 B 进行梯度洗脱(0~3 min, 99%A; 3~5 min, 99%A $\rightarrow$ 55%A; 5~13 min, 55%A $\rightarrow$ 20%A; 13~15 min; 20%A $\rightarrow$ 1%A; 15~18 min, 1%A; 18~18.5 min, 1%A $\rightarrow$ 99%A; 18.5~22 min, 99%A);柱温为 40 °C;流速为 0.3 mL/min;进样体积为 3  $\mu$ L。

质谱条件如下:采用电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)进行正、负离子扫描,扫描范围为  $m/z$  70~1 050;全扫描(full MS)分辨率为 70 000,二级扫描(MS/MS)分辨率为 17 500;鞘气流量为 35 arb,辅助气体流量为 10 arb;毛细管温度为 320 °C;碰撞电压(多级模式)为 20、40、60 V;喷雾电压为 3.5 kV(正离子)和 2.5 kV(负离子)。

### 2.2.3 代谢轮廓分析

取 CON 组、DOX 组、GDOX 组小鼠的心脏组织样品,按“2.2.1”项下方法提取、处理后,再按“2.2.2”项下条件进样检测,记录色谱和质谱信息。利用 Compound Discover 3.2 软件对 3 组小鼠心脏组织样品的原始数据进行色谱峰提取、定位和峰面积归一化处理等,获取各代谢物的分子量、保留时间(retention time, RT)和峰面积等信息。以各代谢物的峰面积(需进行降维处理)为变量,采用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA),以直观展示各组样品的差异性。

### 2.2.4 DEMs 筛选

为进一步分析组间差异并实现样品的有效分离,以各代谢物的峰面积(需进行降维处理)为变量,采用 SIMCA 13.0 软件进行正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),以变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值 $\geq$ 1、峰面积差异倍数(fold change, FC) $>$ 1 且  $P<0.05$  为标准<sup>[8]</sup>筛选 DEMs。

### 2.2.5 生物学分析

借助 HMDB 数据库(<http://www.hmdb.ca/metabolites>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)和 LIPID MAPS 数据库(<https://www.lipidmaps.org/>)对所得 DEMs 进行匹配,然后通过火山图、聚类热图对 DEMs 进行展示;运用 MetaboAnalyst 5.0 在线工具(<https://www.metaboanalyst.ca/>),以  $P<0.05$  作为筛选条件,对 DEMs 进行通路富集分析,并进一步阐释关键代谢物(即实际检测到且与所得富集代谢通路相关的 DEMs)的生物学意义。

## 3 结果

### 3.1 药效学分析结果

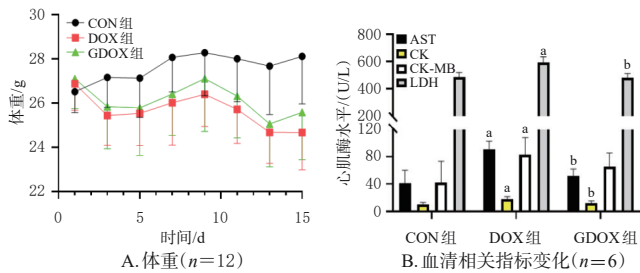
实验期间,CON 组小鼠毛发顺滑,健康状态良好;DOX 组小鼠可见明显的萎靡不振、毛发稀疏等症状,体重随给药次数增加整体呈下降趋势,饮食及活动量减少;而 GDOX 组小鼠的精神状态较 DOX 组有所改善,体重较 DOX 组有所增加,饮食及活动量也随之增加。各组小鼠的体重变化曲线见图 1A。

与 CON 组比较,DOX 组小鼠血清中 AST、CK、CK-MB、LDH 水平均显著升高( $P<0.05$ );与 DOX 组比较,GDOX 组小鼠血清中上述指标水平(CK-MB 除外)均显著降低( $P<0.05$ )。各组小鼠血清中 AST、CK、CK-MB、LDH 水平变化情况见图 1B。

### 3.2 代谢组学分析结果

#### 3.2.1 代谢轮廓分析结果

PCA 结果(图 2)显示,CON 组、DOX 组、GDOX 组小鼠心脏组织样品能明显区分,且组内样品均能较好地聚集,说明 3 组代谢物明显不同。



a: 与CON组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与DOX组比较,  $P < 0.05$ 。

图1 各组小鼠体重及血清中AST、CK、CK-MB、LDH水平变化情况( $\bar{x} \pm s$ )

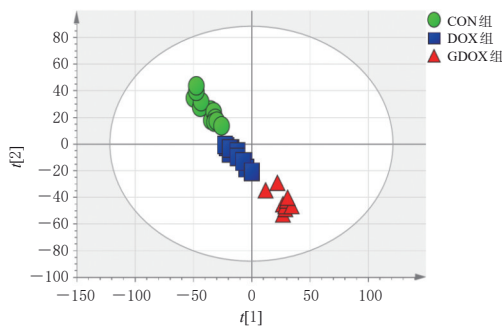


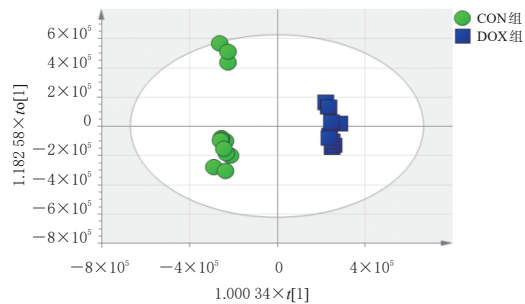
图2 各组小鼠心脏组织样品中代谢物的PCA得分图

OPLS-DA结果(图3)显示, CON组与DOX组、DOX组与GDOX组小鼠心脏组织样品均能完全分离, 说明各组小鼠心脏组织中的代谢物存在明显差异; 采用置换检验对模型进行200次排序验证, 所得 $R^2Y$ (Y轴累积解释率)和 $Q^2$ (累积预测率)均低于右侧原始值, 且 $Q^2$ 与Y轴交于负半轴, 说明模型可靠且不存在过拟合现象, 模型拟合度和预测能力均较好<sup>[8]</sup>, 可用于后续DEMs的筛选。

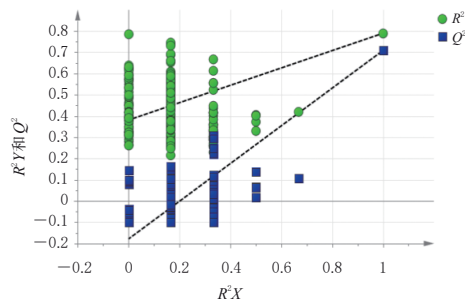
### 3.2.2 DEMs筛选及分析结果

DOX组与CON组间有451个DEMs, GDOX组与DOX组间有548个DEMs(火山图见图4)。将上述DEMs取交集, 获得163个共有DEMs。进一步通过HMDB、PubChem、KEGG、LIPID MAPS数据库匹配, 最终鉴定出37个共有DEMs(表1)。其中, 与CON组比较, DOX组发生变化而经GDOX干预后显著回调的DEMs有25个, 包括DOX组显著上调而GDOX组显著下调的DEMs 17个、DOX组显著下调而GDOX组显著上调的DEMs 8个, 提示GA可通过调节这些内源性代谢物来减轻DOX的心脏毒性(聚类热图见图5)。

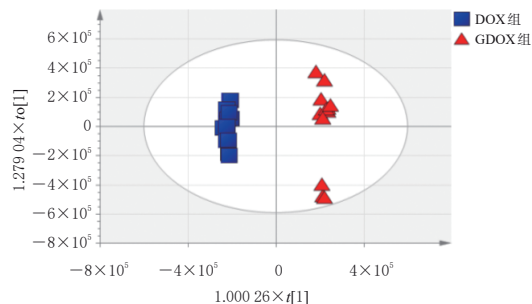
所得DEMs主要涉及的代谢通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢(表2)。通过对富集通路整合分析发现, GA可能通过调控上述代谢通路中关键代谢物[二十二碳六烯酸、花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)和牛磺酸]来减轻DOX所引起的氧化应激、炎症反应、脂质累积, 从而减轻DOX的心脏毒性作用, 机制示意图见图6。



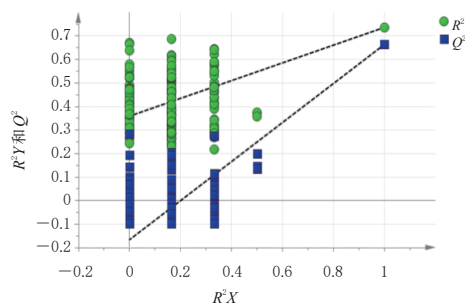
A. CON组与DOX组的OPLS-DA得分图



B. CON组与DOX组的置换检验图

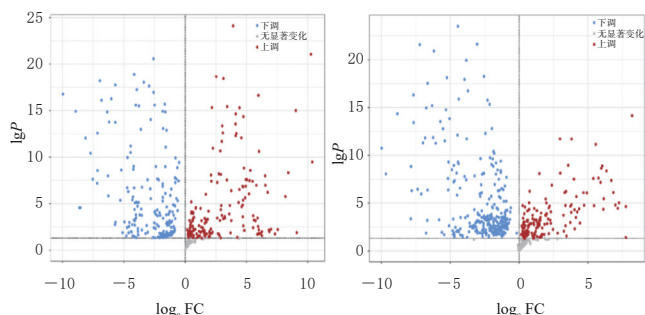


C. DOX组与GDOX组的OPLS-DA得分图



D. DOX组与GDOX组的置换检验图

图3 各组小鼠心脏组织样品中代谢物的OPLS-DA分析结果



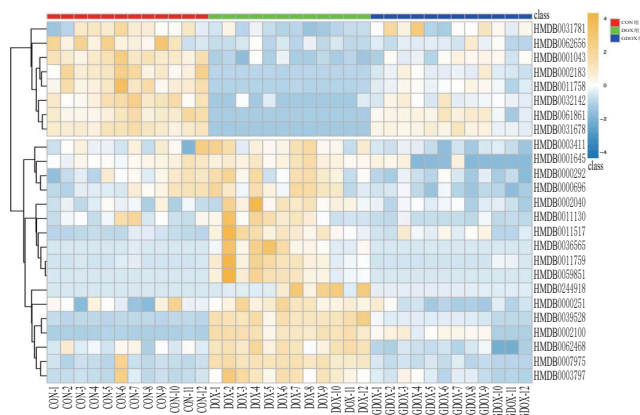
A. DOX组与CON组的DEMs B. GDOX组与DOX组的DEMs

图4 各组小鼠心脏组织样品中DEMs的火山图

表1 DEMs的基本信息

序号	代谢物名称	分子式	RT/min	加合离子	HMDB编号	变化趋势	
						DOX组与CON组	GDOX组与DOX组
1	溶血磷脂(18:0/0:0)	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>2</sub> P	13.99	+H	HMDB0011130	↑ <sup>a</sup>	↓ <sup>b</sup>
2	L-正亮氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	2.39	+H	HMDB0001645	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
3	黄嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.61	+H	HMDB0000292	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
4	溶血磷脂(20:4/0:0)	C <sub>25</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>2</sub> P	11.10	-H	HMDB0011517	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
5	神经酰胺(d18:0/14:0)	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> NO <sub>3</sub>	15.86	+H	HMDB0011759	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
6	L-蛋氨酸	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	1.56	+H	HMDB0000696	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
7	牛磺酸	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	1.99	-H	HMDB0000251	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
8	2-(2-丁氧基乙氧基)乙醇	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	8.23	+H	HMDB0244918	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
9	D-脯氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	1.10	+H	HMDB0003411	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
10	亚油酰胺	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO	14.50	+H	HMDB0062656	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
11	神经酰胺(d18:0/12:0)	C <sub>30</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>3</sub>	15.20	+H	HMDB0011758	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
12	吡啶	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO	14.28	+H	HMDB0031678	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
13	2,4-二甲基苯甲醛	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	10.44	+H	HMDB0032142	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
14	9,11-亚油酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	12.07	+H	HMDB0003797	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
15	依地芬磷	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>	9.22	+H	HMDB0031781	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
16	邻二甲苯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	10.43	+H	HMDB0059851	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
17	二十二碳酰肉碱	C <sub>29</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>4</sub>	15.06	+H	HMDB0062468	↑ <sup>c</sup>	↓ <sup>b</sup>
18	磷脂酰胆碱(16:0/20:5)	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	15.56	+H	HMDB0039528	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
19	二十二碳六烯酸	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	15.05	+H	HMDB0002183	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
20	4-甲氧基肉桂酸	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	15.03	+H	HMDB0002040	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
21	花生四烯酸	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	15.38	+H	HMDB0001043	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
22	磷脂酰胆碱(16:0/18:3)	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	15.53	+H	HMDB0007975	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
23	棕榈酰乙醇酰胺	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	14.35	+H	HMDB0002100	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
24	β-紫罗兰酮	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	16.25	-H	HMDB0036565	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
25	桂皮酸盐	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	15.02	+H	HMDB0061861	↓ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
26	烟酰胺	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	1.63	+H	HMDB0001406	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
27	L-脯氨酸-L-亮氨酸	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.12	+H	HMDB0253028	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
28	柠檬酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	1.57	-H	HMDB000094	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
29	D-4'-泛磷酸酯	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>8</sub> P	2.42	+H	HMDB0001016	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
30	D-焦谷氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	1.20	+H	HMDB0000267	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
31	磷脂酰胆碱(18:1/18:0)	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	15.46	+H	HMDB0008102	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
32	6-姜辣素	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	10.29	-H	HMDB0005783	↓ <sup>c</sup>	↓ <sup>d</sup>
33	黄素腺嘌呤二核苷酸	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>9</sub> O <sub>15</sub> P <sub>2</sub>	6.81	-H	HMDB0001248	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
34	2,6-二甲基苯胺	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	6.27	+H	HMDB0060677	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
35	1,2,3-苯并三唑	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	21.07	+H	HMDB0244873	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
36	胶质毒素	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	2.18	-H	HMDB0252746	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>
37	甲氧肾上腺素	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	1.74	-H	HMDB0004063	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>d</sup>

↑:升高;↓:降低;a:与CON组比较,P<0.05;b:与DOX组比较,P<0.01;c:与CON组比较,P<0.01;d:与DOX组比较,P<0.05。

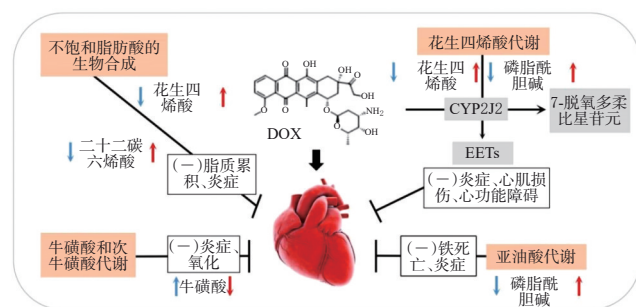


CON-1~CON-12: CON组小鼠心脏组织; DOX-1~DOX-12: DOX组小鼠心脏组织; GDOX-1~GDOX-12: GDOX组小鼠心脏组织。

图5 各组小鼠心脏组织样品中DEMs的聚类热图

表2 DEMs的主要代谢通路信息

序号	代谢通路	富集代谢物/个	关键代谢物	P
1	不饱和脂肪酸的生物合成	36	二十二碳六烯酸、花生四烯酸	0.010 823
2	花生四烯酸代谢	36	花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)	0.010 823
3	亚油酸代谢	5	磷脂酰胆碱(16:0/18:3)	0.023 056
4	牛磺酸和次牛磺酸代谢	8	牛磺酸	0.036 669



橙色方框:DEMs可能参与调控的代谢通路;灰色方框:本研究未检测到,但可能与代谢通路有关联的代谢物;CYP2J2:细胞色素P450 2J2 (cytochrome P450 2J2);EETs:环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids);蓝色“↓”:与CON组比较,其代谢物在DOX组样品中的表达有所降低;蓝色“↑”:与CON组比较,其代谢物在DOX组样品中的表达有所升高;红色“↓”:与DOX组比较,其代谢物在GDOX组样品中的表达有所降低;红色“↑”:与DOX组比较,其代谢物在GDOX组样品中的表达有所升高;(-):减轻或抑制作用。

图6 DOX心脏毒性的作用机制示意图

4 讨论

DOX可用于治疗多种实体瘤和血液恶性肿瘤,然而该药的剂量依赖性心脏毒性严重影响了其临床应用。近年来,越来越多的证据表明,中药提取物及相关制剂联合DOX可减轻DOX的心脏毒性<sup>[9]</sup>,但中药具有多成分、多靶点的特点,其错综复杂的作用机制使其进一步开发、利用受限。目前,学者主要通过检测疾病相关生化或病理指标来阐释中药对疾病的干预作用,但这些检测手段难以体现中药复杂、多样的治疗特点。代谢组学可动态监测生物体受干扰后内源性代谢物的变化情况,并可通过代谢物与疾病间的调控关系来揭示药物治疗疾病的潜在机制。因此,代谢组学是研究中药、中药提取物及相关制剂复杂作用及机制的有效手段之一。

本研究在前期实验的基础上,以DOX诱导制备心脏毒性模型小鼠,并考察了各组小鼠血清中4种心肌酶(AST、CK、CK-MB、LDH)的变化情况。结果显示,DOX导致小鼠上述指标显著升高,提示小鼠心脏已经受损;以GA进行干预后,小鼠血清中上述指标(CK-MB除外)均显著降低,说明GA可减轻DOX的心脏毒性。随后,本研究采用UHPLC-MS/MS技术对3组小鼠心脏组织样品进行代谢组学研究。结果显示,本研究筛选出37个共有DEMs;与CON组比较,DOX组发生变化而GDOX组显著回调的DEMs有25个。DEMs富集的代谢通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢,其关键代谢物包括二十二碳六烯酸、花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)和牛

磺酸。其中,与CON组比较,DOX组小鼠心脏组织中二十二碳六烯酸、花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/20:5)、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)的表达均显著下调;而经GA干预后,上述指标均显著上调,提示这些代谢物可能是GA减轻DOX心脏毒性的潜在靶点。此外,与CON组比较,DOX组小鼠心脏组织中牛磺酸的表达升高;经GA干预后,小鼠心脏组织中牛磺酸的表达显著下调,提示GA可能通过下调牛磺酸的表达来减轻DOX的心脏毒性。

二十二碳六烯酸是一种人体必需的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸。研究表明,该成分可通过抑制脂质超载、减少细胞凋亡来提升脂质超载所致损伤细胞的活力;同时,该成分还可通过发挥抗氧化作用来减轻DOX致大鼠急性心肌梗死后的心肌纤维化程度<sup>[10]</sup>。花生四烯酸是一种 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸,可经CYP2J2酶代谢生成EETs;同时,DOX可被CYP2J2酶代谢生成7-脱氧多柔比星苷元,后者可通过竞争性结合CYP2J2酶的活性位点而导致花生四烯酸介导的心肌损伤修复过程受阻<sup>[11]</sup>。磷脂酰胆碱亦称卵磷脂,在心肌细胞中广泛表达。DOX可使磷脂酰胆碱氧化生成氧化磷脂,该产物可影响线粒体中钙离子变化及铁死亡过程,从而引起细胞死亡<sup>[12]</sup>。研究指出,发生心肌梗死或HF时,机体磷脂酰胆碱代谢会出现紊乱;而磷脂酰胆碱可参与调控氧化应激、炎症反应等过程,对心肌损伤有一定的改善作用<sup>[13]</sup>。牛磺酸是一种 $\beta$ -氨基酸,在心脏中含量较高。DOX可引起心脏组织中铁水平升高而导致氧化应激的发生,而牛磺酸可通过调节谷胱甘肽的表达来缓解铁介导的心脏组织氧化应激,并可增强机体抗氧化作用以保护心脏组织免受DOX心脏毒性的损害<sup>[14]</sup>。

综上所述,GA可能通过作用于二十二碳六烯酸、花生四烯酸、磷脂酰胆碱(16:0/18:3)和牛磺酸等关键代谢物来调节不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢途径,进而减轻DOX的心脏毒性。

## 参考文献

[1] KCIUK M, GIELECIŃSKA A, MUJWAR S, et al. Doxorubicin: an agent with multiple mechanisms of anticancer activity[J]. *Cells*, 2023, 12(4):659.

[2] RAWAT P S, JAISWAL A, KHURANA A, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 139:111708.

[3] KIM J K, CHOI M S, KIM J Y, et al. *Ginkgo biloba* leaf extract suppresses intestinal human breast cancer resistance protein expression in mice: correlation with gut microbiota[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 140:111712.

[4] JASIM S T, AL-KURAI SHY H M, AL-GAREEB A I.

*Ginkgo biloba* protects cardiomyocytes against acute doxorubicin induced cardiotoxicity by suppressing oxidative stress[J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(Suppl 3)(8):S103-S107.

[5] 宋忠军,朱晓青,何艳,等.银杏黄酮苷元对多柔比星治疗肝癌的增效减毒作用[J]. *中国药房*, 2022, 33(16):1937-1942,1949.

SONG Z J, ZHU X Q, HE Y, et al. Effects of increasing efficacy and decreasing toxicity of ginkgo flavone aglycone on doxorubicin in the treatment of liver cancer[J]. *China Pharm*, 2022, 33(16):1937-1942,1949.

[6] FAZZINI L, CAGGIARI L, DEIDDA M, et al. Metabolomic profiles on antitubercular cardiotoxicity: new perspectives for early diagnosis and cardioprotection[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(22):6745.

[7] WU G S, LI H K, ZHANG W D. Metabolomics and its application in the treatment of coronary heart disease with traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5):321-330.

[8] SHAO M M, XIANG H J, LU H, et al. Candidate metabolite markers of peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2 diabetes[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(8):5420-5440.

[9] SUN X, ZHU Y M, LI F, et al. Cardioprotective mechanism and active compounds of *Folium ginkgo* on adriamycin-induced cardiotoxicity: a network pharmacology study[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022:4338260.

[10] CARRASCO R, RAMIREZ M C, NES K, et al. Prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity by pharmacological non-hypoxic myocardial preconditioning based on docosahexaenoic acid (DHA) and carvedilol direct antioxidant effects: study protocol for a pilot, randomized, double-blind, controlled trial (CarDHA trial) [J]. *Trials*, 2020, 21(1):137.

[11] ARNOLD W R, DAS A. An emerging pathway of doxorubicin cardiotoxicity mediated through CYP2J2[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(16):2294-2296.

[12] KOLEINI N, NICKEL B E, EDEL A L, et al. Oxidized phospholipids in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 303:35-39.

[13] RONG J D, HE T M, ZHANG J Y, et al. Serum lipidomics reveals phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine disorders in patients with myocardial infarction and post-myocardial infarction-heart failure[J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1):66.

[14] BARIŞ V Ö, GEDIKLI E, YERSAL N, et al. Protective effect of taurine against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: echocardiographical and histological findings[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(10/11/12):1649-1655.

(收稿日期:2023-09-18 修回日期:2024-01-03)

(编辑:张元媛)