

# 基于代谢组学方法研究生半夏和姜半夏对 BeWo 细胞的毒性机制

申士富<sup>1,2</sup>, 单进军<sup>1,3</sup>, 谢辉辉<sup>4</sup>, 徐建亚<sup>1,3</sup>, 汪小蓉<sup>1\*</sup>, 狄留庆<sup>1,2\*</sup>

(1.南京中医药大学附属医院,江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室,江苏 南京 210023;2.南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;3.南京中医药大学医学代谢组学中心,江苏 南京 210023;4.浙江省中医院儿科,浙江 杭州 310006)

**摘要:**目的 通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析生半夏和姜半夏干预后细胞内代谢物改变,来评价生半夏和姜半夏潜在的发育毒性。方法 采用胎盘组织来源的 BeWo 细胞系构建体外胎盘模型,运用 GC-MS 检测细胞经生半夏及姜半夏干预后细胞内所含代谢物及其相对含量的变化。结果 细胞代谢物中共鉴定出甘氨酸、氨基丙二酸、脯氨酸、葡萄糖、半乳糖、硬脂酸、肌醇等九种差异性代谢物。结论 运用 GC-MS 代谢组学技术评价半夏及姜半夏的发育毒性具有可行性。

**关键词:**气相色谱-质谱联用;半夏;姜半夏;BeWo 细胞;发育毒性

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2017)03-0295-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0295

## Metabolomic Approach to Evaluating Fetal Toxicity of Pinellia Rhizoma and Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumina Based on BeWo *in vitro* Placenta Model

SHEN Shi-fu<sup>1,2</sup>, SHAN Jin-jun<sup>1,3</sup>, XIE Hui-hui<sup>4</sup>, XU Jian-ya<sup>1,3</sup>, WANG Xiao-rong<sup>1\*</sup>, DI Liu-qing<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 3. Medical Metabolomics Center, Nanjing, 210023, China; 4. Department of Pediatrics, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, 310006, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To evaluate the potential developmental toxicity of Pinellia Rhizoma(BX) and Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumina(JBX) by analyzing the changes of intracellular metabolites after the intervention of BX and JBX by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **METHODS** The BeWo cell line derived from placenta tissue was used to construct the model of the *in vitro* placenta, and the changes of the metabolites and their relative contents in the cells were detected by GC-MS after the intervention of BX and JBX. **RESULTS** The nine metabolites of glycine, alanine, proline, glucose, galactose, stearic acid, inositol and so on were identified. **CONCLUSION** GC-MS technology is feasible for evaluation of developmental toxicity of BX and JBX.

**KEY WORDS:**GC-MS; Pinellia Rhizoma; Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumina; BeWo cell line; developmental toxicity

胎盘作为母体和胎儿之间的主要接触面,在胚胎和胎儿发育过程中发挥重要作用。由于药物发育毒性评价无法直接开展临床试验,本文拟通过体外实验评价生半夏和姜半夏的潜在发育毒性。鉴于对胎儿同样重要的羊水和母体血液样本无法有效建立体外模型进行实验,所以本文采用胎盘组织来源的 BeWo 细胞构建体外胎盘模型进行实验以评价生半夏和姜半夏对体外胎盘细胞代谢的影响。

## 1 材料

### 1.1 细胞

BeWo 细胞购自中国典型培养物保藏中心,保

存于南京中医药大学江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室。

### 1.2 实验试剂

1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-肉蔻酸、N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺(BSTFA)、含 1% 三甲基氯硅烷(TMCS)、C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>烷烃系列标准品、吡啶、甲氧胺、正己烷(美国 Sigma-Aldrich 公司);丙酮(韩国 Duksan 公司);F-12K 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)溶液、青霉素/链霉素溶液(加拿大 Wisent 公司);二甲基亚砜(DMSO)(北京索莱宝公司);磷酸缓冲盐溶液(PBS):NaCl 8 g,

收稿日期:2017-03-04;修稿日期:2017-04-25

基金项目:国家自然科学基金(81303299);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介:申士富(1991-),男,江苏泰州人,南京中医药大学 2014 级硕士研究生。\*通信作者:rcrystal@tom.com;diliuqing928@163.com

KCl 0.2 g, 12H<sub>2</sub>O \* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.85 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27 g, 加纯水定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌后使用。

F-12K 完全培养基: 含 10% (v/v) 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素。

### 1.3 实验仪器

AS 1310 自动进样器、Trace 1310 气相色谱仪、TSQ 8000 三重四极杆质谱仪、TG-5MS 气相色谱柱、Savant SPD 1010 SpeedVac 真空浓缩仪(美国 Thermo Fisher 公司); Allegra 64R 高速冷冻台式离心机(美国 Beckman Coulter 公司); CPA225D/BSA124S-CW(德国 Sartorius 公司); Forma Steri-Cycle CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); MiniSpin/5810R/5702 离心机(德国 Eppendorf 公司); Muse 细胞分析仪(德国 Merck Millipore 公司); Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)。

### 1.4 实验药物

生半夏及姜半夏溶液分别使用 F-12K 培养基稀释 10 倍, 使得生半夏和姜半夏浓度为 20 mg/mL。使用相同体积生理盐水和相同稀释倍数以获取对照组工作液。

## 2 方法

### 2.1 BeWo 细胞的培养和样本的获取

使用 F-12K 完全培养基培养 BeWo 细胞。培养瓶置于含 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中。采用每周 3~4 次的频率换液, 传代时吸弃原培养基, 使用胰酶/乙二胺四乙酸(EDTA)分散细胞后, 加入完全培养基使用移液器轻轻吹打以制备单细胞悬液, 按照 1:3 比例传代。

获得足量细胞后, 采用胰酶/乙二胺四乙酸(EDTA)分散细胞后制备单细胞悬液。以每孔 2 × 10<sup>5</sup> 密度种植细胞于 6 孔板中, 补足完全培养基至每孔 2.5 mL。待细胞达到 90% 汇合率时(约 2 d), 吸弃旧培养基, 分别给予每孔 140 μL 对照组、生半夏和姜半夏工作液后补充培养基至 2.5 mL(终浓度为 1 mg/mL)。在 6、12、24、36 h 分别弃培养液, 生理盐水冲洗 2 遍后, 迅速加入液氮约 3 mL 进行淬灭, 待液氮挥发后加入 300 μL 纯水, 样品制备前放于 -80 °C 冰箱<sup>[1]</sup>。

### 2.2 BeWo 细胞样本的处理

上述样本经历 -80 °C 冰冻 60 min, 37 °C 融化 30 min 3 次冻融循环后, 使用移液器反复冲洗 10 遍以保证细胞分离。取上述提取液 20 μL 进行 BCA

蛋白定量分析(见下述), 剩余约 280 μL 提取液加入 900 μL 甲醇溶液(含内标 1, 2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-肉蔻酸 22.5 μg), 涡旋 5 min 后离心(15 000 r/min, 10 min), 取 450 μL 上清离心浓缩仪挥干(45 °C, 14 Vac, ~2 h)。

向上述样本中加入 30 μL 甲氧胺吡啶溶液(10 mg/mL), 涡旋 1 min 后震荡 1.5 h(30 °C, 600 r/min); 再次加入 30 μL BSTFA(含 1% TMCS)溶液后, 涡旋 1 min 后震荡 0.5 h(37 °C, 600 r/min), 取上清 50 μL 用于 GC-MS 分析。

BCA 蛋白定量分析: 使用白蛋白标准品按照说明书稀释不同比例制备 1 组白蛋白标准液(适用范围 20~2 000 μg/mL), 每个样本分别加入 A 和 B 工作液(50:1)后, 37 °C 孵育 30 min 后, 使用微孔板检测仪在 562 nm 检测光密度(OD)值。使用上述稀释标准液建立标准曲线后, 计算待测样本蛋白含量。

### 2.3 气相色谱和质谱分析条件

色谱条件: 色谱柱为 TG-5MS 气相色谱柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)。载气为 He<sub>2</sub>, 设置恒定流速为 1.2 mL/min, 采用分流模式, 分流流速为 24.0 mL/min, 分流比为 20:1, 进样口温度为 250 °C, 升温程序: 起始温度 60 °C, 保持 1 min 后, 以 20 °C/min 速率升至 320 °C 后, 保持 5 min, 样品进样体积为 1 μL。

质谱条件: 采用 EI 模式, 离子传输线温度为 250 °C, 离子源温度为 280 °C, 电离能为 70 eV, *m/z* 采集范围为 50~500, 采集时间 3.5~19 min。

### 2.4 数据采集与分析

使用仪器自带软件 Xcalibur 2.2 采集原始数据, 通过扣除衍生化试剂背景后筛选候选色谱峰, 并使用 Xcalibur 内置的 NIST 14 数据库通过比对数据库碎片信息和本次实验所采集碎片信息以及匹配度(match factor/SI)、反向匹配度(reverse match factor/RSI)、可能性(probability/Prob)和相关化合物保留指数(Retention Index, RI), 初步判断色谱峰所代表的化合物信息。

本研究采用化合物色谱峰峰面积进行相对定量分析。使用 Xcalibur 建立处理方法以提取各样品各色谱峰峰面积, 通过选取各色谱峰相对特异性碎片对其进行相对定量分析。具体参数设置如下: 色谱峰检测方式为 ICIS, 平滑点为 7, 基线窗口为 40, 面积噪声因子为 5, 峰噪声因子为 10, 其他参数采用软件默认值。进而获取各推断化合物色谱峰与内标峰面积比率(以下简称峰面积比率)。为纠正不同细

胞数量所致的代谢物引起的改变,使用各样本蛋白浓度对各样本代谢物进行进一步校正<sup>[2]</sup>。

通过建立包含色谱峰推断化合物名称,样品名称和峰面积比率的三维矩阵用于 SIMCA 进行多维变量统计分析。数据标尺化采用 UV 方式,通过软件自动拟合选项使用交叉验证规则来自动拟合模型并获取有显著差异成分。使用上述所构建 OPLS-DA 模型辨识组间的差异并通过得分图进行可视化处理。模型的匹配度验证同样使用  $R^2 X$ ,  $R^2 Y$  和  $Q^2$  等指标。

### 2.5 潜在生物标记物及代谢通路的寻找

在 OPLS-DA 模型中计算 VIP 值,当 VIP 值大于 1 时,表示该变量对解释该模型中的 Y 变量较为重要,在本实验研究中表明推断化合物为多维统计有差异的代谢物;同时对各组峰面积比率使用 SPSS18.0 进行 one-way ANOVA 分析,双尾  $P < 0.05$  时表示有差异。对本实验而言,同时满足  $VIP > 1$  和  $p < 0.05$  为最终差异性代谢物。

对于上述差异代谢产物的鉴定采取比对 NIST 2014 数据库信息,对于 SI 和 RSI 值大于 700 以及可能性  $> 60\%$  (由于同分异构体存在,糖类除外)认为有较好的匹配度,进一步比对保留指数,最终采取实验室所购买部分标准品进行鉴定。

使用 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 中代谢通路分析工具 (MetPA) 分析和可视化上述鉴定代谢物可能涉及的代谢通路,从代谢通路方面阐释生半夏和姜半夏对 BeWo 细胞代谢可能的干扰机制。

## 3 结果

### 3.1 BeWo 细胞代谢轮廓分析和模式分析

3.1.1 BeWo 细胞样本代谢轮廓分析 在前述 GC-MS 条件下,对照组、生半夏和姜半夏干预后不同时间点 BeWo 细胞样本典型 TIC 图谱见图 1。通过图

中对各组不同时间点 TIC 图谱的拟合和比对,可以看出在对照组、生半夏和姜半夏干预后不同时间点 BeWo 细胞样本有较多的色谱峰存在差异,这些差异提示在生半夏和姜半夏干预后不同时间点 BeWo 细胞内部分代谢物含量发生了改变。

按照 2.4 部分所述方法对 BeWo 细胞样本提取物中色谱峰进行推断并获取峰面积比率后,使用样本名、推测化合物名称、峰面积比率建立三维数据矩阵并使用 SIMCA 软件进行多维分析。所构建 OPLS-DA 模型得分图见图 2。

在得分图中可以看出对照组、生半夏和姜半夏干预后 BeWo 细胞样本能与干预前 (即 0 h) 的细胞样本明显分开,在干预后不同时间点三组细胞样本具有相同的趋势。在干预 6 h 时,生半夏组中各样本相较姜半夏各组样本与正常组有更多的重合,说明在该时间点姜半夏较生半夏更能引起 BeWo 细胞内代谢物的改变;在干预 12 h 时,三组间有较多重合之处,表明三组间在该时间点细胞内代谢物差异较小;在干预 24 h 时,姜半夏组各样本大部分与正常组重合,而生半夏组中各样本基本与正常组、姜半夏组明显分开,说明在该时间点生半夏能引起 BeWo 细胞内代谢物的显著改变,而姜半夏则相反;在干预 36 h 时,姜半夏组中各样本与对照组中各样本明显分开,而生半夏组中样本明显分散,与对照组和姜半夏组均有部分重合,说明在该时间点姜半夏能引起 BeWo 细胞内代谢物的显著改变;而生半夏组中各样本则表现出明显的异质性则说明在该时间点生半夏引起细胞内代谢物的变化具有较明显样本间差异。生半夏组样本在各时间点样本相对姜半夏组和对照组样本分散,同样表明生半夏组各样本干预后表现出的异质性。本模型  $R^2 X = 0.928$ ,  $R^2 Y = 0.558$ ,  $Q^2 = 0.455$ , 表明建立数学模型可靠。

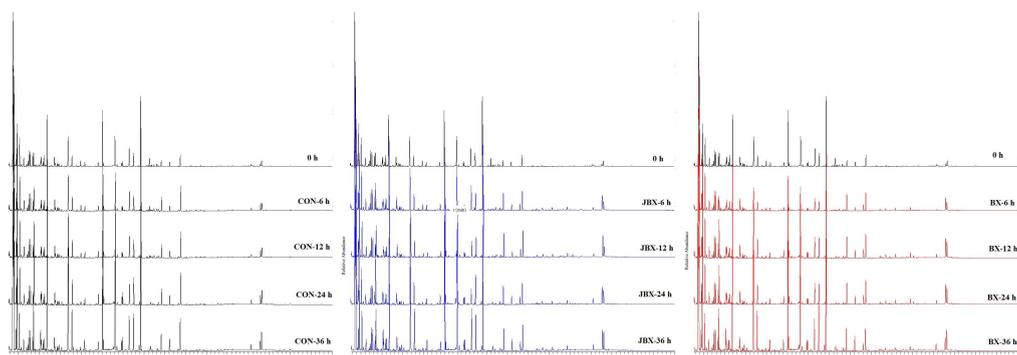


图 1 基于 GC-MS 对照组 (CON)、生半夏 (BX) 和姜半夏 (JBX) 干预后不同时间点 BeWo 细胞的典型 TIC 图

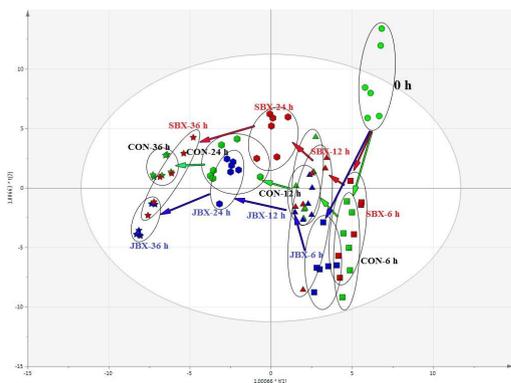


图 2 对照组(CON)、生半夏(BX)和姜半夏(JBX)干预后不同时间点 BeWo 细胞样本 OPLS-DA 得分图  
( $R^2 X=0.928, R^2 Y=0.558, Q^2=0.455$ )

### 3.2 BeWo 潜在生物标记物的筛选和鉴定

使用图 2 所示 OPLS-DA 模型计算羊水样本中各变量的 VIP 值,选取 VIP 值 $>1$ 的变量,初步筛选出 26 个差异性代谢物(图 3)。同时对上述变量峰面积比率进行 one-way ANOVA 分析,试图比较各组间代谢物含量的改变。

采用 2.5 部分所述代谢物鉴定方法,上述差异性代谢物中共鉴定出 9 个潜在生物标记物(表 1,图 4),上述代谢物属于氨基酸类、糖类、脂类和其他小分子物质。在与对照组比较中,上述大部分代谢物在生半夏和姜半夏干预 6 h 时含量较对照组出现明显改变,其中甘氨酸、氨基丙二酸、脯氨酸、葡萄糖、半乳糖、硬脂酸在、肌醇在生半夏或者姜半夏干预后含量出现明显降低,而柠檬酸、胆固醇则在生半夏或者姜半夏干预后含量则出现升高。

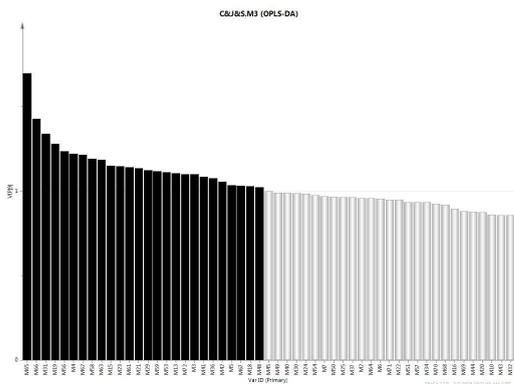


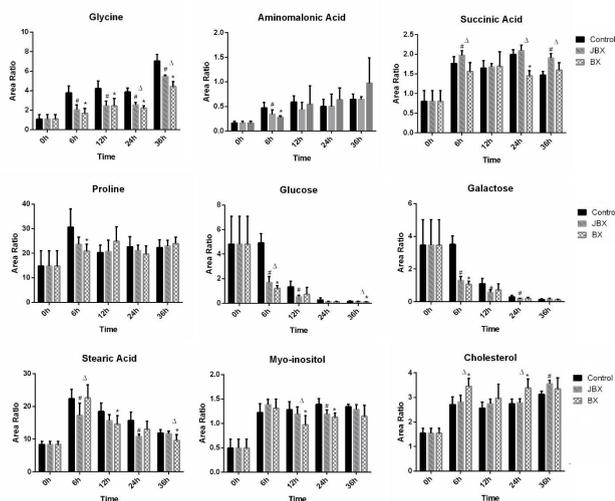
图 3 基于 BeWo 细胞样本内代谢物 OPLS-DA 分析的 VIP 图  
仅显示部分代谢物,黑色标注为 VIP 值 $>1$ 的代谢物除外氨基丙二酸、脯氨酸含量仅在干预 6 h 时较正常值出现明显改变,其它代谢物含量在大部分干预时间点均较对照组出现改变,其中 BeWo 细胞中甘氨酸、葡萄糖、半乳糖、硬脂酸、肌醇含量较对

照组大部分表现出明显降低,而柠檬酸、胆固醇则大部分表现出明显升高。

表 1 BeWo 细胞中潜在生物标记物及 VIP 值

代谢物	VIP <sup>†</sup>	代谢物	VIP <sup>†</sup>
甘氨酸 <sup>§</sup>	1.10	半乳糖	1.05
氨基丙二酸	1.28	硬脂酸 <sup>§</sup>	1.11
丁二酸 <sup>§</sup>	1.13	肌醇 <sup>§</sup>	1.18
脯氨酸 <sup>§</sup>	1.14	胆固醇 <sup>§</sup>	1.10
葡萄糖 <sup>§</sup>	1.08		

注:“<sup>†</sup>”VIP 值是从图 2 的偏最小二乘回归模型中得到的,“<sup>§</sup>”经标准品验证。



注: $\bar{x} \pm s$ ,姜半夏组与对照组比较,# $P<0.05$ ;生半夏组与对照组比较,\* $P<0.05$ ;生半夏组与姜半夏组比较,Δ $P<0.05$ 。

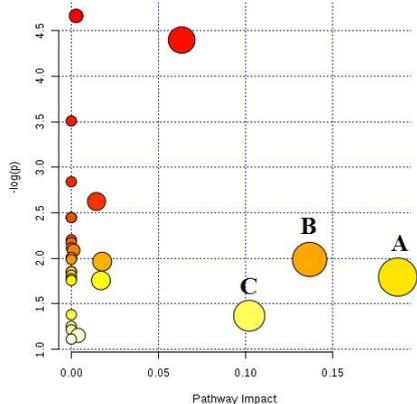
图 4 对照组、生半夏和姜半夏干预后 BeWo 细胞样本中经鉴定差异性代谢物变化

在生半夏组与姜半夏组上述代谢物含量比较中,生半夏组样本中甘氨酸、柠檬酸、葡萄糖、肌醇含量在部分时间点较姜半夏组样本明显降低,生半夏组样本中胆固醇含量则较姜半夏组样本明显升高;而生半夏组中硬脂酸含量在不同时间点与姜半夏组样本相比并没有相同的改变趋势,如在 6h 出现升高、而在 36h 出现降低。

### 3.3 代谢通路分析

为了探索生半夏和姜半夏干预后可能涉及到的代谢通路,按照 2.5 部分所述方法将上述潜在生物标记物使用 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>)中的代谢通路分析模块进行分析,共 28 条可能涉及到的通路,结果见图 5、表 2。图中纵坐标 $-\log(p)$ 使用从白到深红的颜色(由高到低)来表示富集分析所得结果,然而上述通路的富集分析结果均没有显著性。圆圈的大小表示通路影响值的大小,是使用通路拓扑分析计算所得到的结

果。本研究将代谢通路影响值大于 0.1 作为筛选条件,即当某一条代谢通路影响值大于 0.1 时,认为其是可能涉及到的代谢通路<sup>[3]</sup>。根据以上内容,本研究涉及的代谢通路分别是:甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,磷酸肌醇代谢,精氨酸和脯氨酸代谢。



A.甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;B.磷酸肌醇代谢;C.精氨酸和脯氨酸代谢

图 5 生半夏和姜半夏干预后 BeWo 细胞样本代谢通路分析

#### 4 讨论

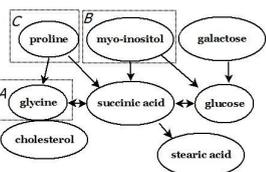
胚胎和胎儿的生长主要取决于可利用的营养物质,而这与胎盘的大小、形态、血液供应、转运能力和子宫胎盘组织对营养物质的合成和代谢密切相关。在常见的营养物质中,葡萄糖是胎儿主要的能量来源,而氮和蛋白质的堆积是胎儿生长、母体和胎儿新生组织的必需成分<sup>[4]</sup>。

尽管胎儿需要大量的葡萄糖作为主要的能量来源,但是胎盘所摄取约 70% 葡萄糖没有进一步转运给胎儿,而是主要通过氧化作用后用于胎盘的自身代谢<sup>[5]</sup>。如果胎盘能量缺乏进而消耗本应供应至胎儿的能量,最终胎盘可丧失相应功能而且必然影响胎儿的生存。而半乳糖在生物体糖类中占较少比例且主要进入葡萄糖途径进行代谢。图 3 中生半夏和姜半夏干预后的 BeWo 细胞内葡萄糖和半乳糖含量在大部分时间点均较正常组明显降低,并且生半夏组样本中葡萄糖含量在 6 h 和 36 h 较姜半夏组样本明显降低,提示糖类的合成受到抑制或者分解加速,进而会导致 BeWo 细胞能量供应受损。而琥珀酸作为三羧酸循环的中间产物,其含量在姜半夏组和生半夏组出现不同的改变。在姜半夏干预下,BeWo 细胞内琥珀酸含量在 6、24、36 h 均较正常组含量明显升高,而生半夏组样本中含量仅在 24 h 较对照组含量明显降低,其余时间点与对照组相比较未见明显改变。结合上述糖类尤其是葡萄糖含量在不同时间点的改变,姜半夏组琥珀酸含量的升高原因可能是葡萄糖大量消耗进入三羧酸循环进而引起琥珀酸含量升高,而生半夏组琥珀酸含量降低则提示由于葡萄糖含量的进一步减少可能不足以代偿细胞的能量需求导致的。

表 2 生半夏和姜半夏干预后 BeWo 细胞样本代谢通路分析部分结果

代谢通路*	Total <sup>#</sup>	Expected	Hits <sup>+</sup>	Raw $p$ <sup>‡</sup>	$-\log(p)$	Holm adjust <sup>§</sup>	FDR	Impact
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	48	0.18	1	0.17	1.80	1.00	0.63	0.19
磷酸肌醇代谢	39	0.15	1	0.14	1.99	1.00	0.63	0.14
精氨酸和脯氨酸代谢	77	0.29	1	0.25	1.37	1.00	0.85	0.10
初级胆汁酸生物合成	47	0.18	2	0.01	4.40	0.97	0.49	0.06
丁酸代谢	40	0.15	1	0.14	1.96	1.00	0.63	0.02
淀粉与蔗糖的代谢	50	0.19	1	0.17	1.76	1.00	0.63	0.02
柠檬酸循环(三羧酸循环)	20	0.07	1	0.07	2.62	1.00	0.63	0.01

注:“\*”影响值 $>0$ 的代谢途径;“#”表示代谢通路中相关的代谢产物总数;“+”上传数据中实际匹配的物质数量;“‡”富集分析计算得出的原始  $P$  值;“§”采用 Holm Bonferroni 法调整得出的  $P$  值;“”FDR 是校正假阳性后得出的  $P$  值;“&”路径拓扑分析计算得出的通路的影响值。



A.甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;B.磷酸肌醇代谢;C.精氨酸和脯氨酸代谢

图 6 生半夏和姜半夏干预 BeWo 细胞样本潜在生物

#### 标记物代谢网络示意图

脯氨酸作为一种功能性氨基酸,动物实验表明

在胎盘、胚胎和胎儿发育中发挥重要作用<sup>[6]</sup>,如脯氨酸是胎盘合成鸟氨酸和多胺类物质的一种主要氨基酸底物,妊娠早期维持脯氨酸较高含量具有重要意义;胎盘对脯氨酸的转运以及脯氨酸氧化酶活性与宫内发育受限的胎儿和胎盘的的生长相关,动物模型同样表明胎盘和胎儿液体中脯氨酸和多胺类物质的含量增加有利于胎儿的生长<sup>[7]</sup>。而生半夏、姜半夏干预后所引起的脯氨酸、甘氨酸和肌醇含量的降低

都提示在两者干预对胎盘和胎儿代谢可能的不利影响;生半夏组样本中含量的进一步降低甚至与姜半夏组样本在多个时间点出现显著差异,则提示生半夏所引起的不利影响较姜半夏更为严重。

氨基丙二酸被认为来源于蛋白质合成错误或者蛋白质合成时甘氨酸残基的氧化损害<sup>[8]</sup>。关于此代谢物的背景知识较少,很难探讨生半夏和姜半夏干预后所引起氨基丙二酸含量降低所导致的影响。

硬脂酸作为一种常见的脂肪酸,除了来自母体,胎盘滋养层细胞可以合成和释放少量硬脂酸<sup>[9]</sup>。在生半夏和姜半夏的干预后硬脂酸较正常组大部分时间点含量明显降低,但经检索文献,仅有少量文献报道宫内生长受限患儿(IUGR)母体血浆硬脂酸含量较适龄胎儿下降<sup>[10]</sup>。鉴于母体血浆中同样有食物来源的硬脂酸,而本部分细胞实验无法考察母体因素影响,生半夏和姜半夏对母体、胎盘和胎儿脂肪酸的干预有待进一步研究。

胆固醇作为细胞膜必要成分、甾体类激素和胆酸的前体物质,在胚胎和胎儿发育中具有重要作用<sup>[11]</sup>。尽管胎儿体内的大部分胆固醇来源于胎儿肝脏自身合成,但是在胎儿大多数重要器官发生期时,其所需胆固醇以母体胆固醇作为主要来源<sup>[12]</sup>,而胎盘在调节胆固醇方面发挥重要作用<sup>[13]</sup>。母体高胆固醇血症可以引起肝细胞的凋亡、碱性磷酸酶活性增强和 DNA 结构破坏进而导致发育中的胎仔肝脏结构紊乱和大量肝细胞受损,这些效应可能是氧化应激、自由基以及 caspase-3 和 caspase-9 活性增加所致<sup>[14]</sup>。同时有研究表明人类胎儿主动脉普遍存在血管脂肪条纹(streak)形成等动脉粥样硬化前期表现并且母体高胆固醇血症可明显加速这一进程进而可能在儿童期出现动脉粥样硬化<sup>[15]</sup>。而且动物实验表明母体高脂肪高胆固醇血症饮食可以影响兔胚胎基因表达,进而引起胎儿生长落后和成年后的代谢性疾病<sup>[16]</sup>。在生半夏和姜半夏干预后 6、24、36 h 可见细胞内胆固醇含量较对照组明显升高,提示可能会导致胎盘和胎儿体内胆固醇含量增加进而引起上述损害;而生半夏所引起的胆固醇含量在 6、24 h 较姜半夏明显升高,同样提示生半夏较姜半夏引起的更加严重的不利影响。在胆固醇所参与的胆汁酸代谢中,甘氨酸作为哺乳动物结合胆汁酸的主要氨基酸,在胆汁酸代谢以及对脂质和脂溶性维生素消化吸收中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。甘氨酸含量的降低和胆固醇含

量的增加同样揭示生半夏和姜半夏干预后所进而对胆汁酸代谢的干扰。

#### 参考文献:

- [1] LORENZ MA, BURANT CF, KENNEDY RT. Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(9): 3406-3414.
- [2] CAO B, LI M, ZHA W, et al. Metabolomic approach to evaluating adriamycin pharmacodynamics and resistance in breast cancer cells[J]. *Metabolomics*, 2013, 9(5): 960-973.
- [3] SU S, DUAN J, WANG P, et al. Metabolomic study of biochemical changes in the plasma and urine of primary dysmenorrhea patients using UPLC-MS coupled with a pattern recognition approach[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 852-865.
- [4] KALHAN SC. Protein metabolism in pregnancy[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(5 Suppl): 1249S-1255S.
- [5] MCCLELLAN R, NOVAK D. Fetal nutrition: how we become what we are[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2001, 33(3): 233-244.
- [6] WU G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1-17.
- [7] WU G, BAZER FW, DATTA S, et al. Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development[J]. *Amino Acids*, 2008, 35(4): 691-702.
- [8] JU HK, CHUNG HW, LEE HS, et al. Investigation of metabolite alteration in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by GC-MS[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(1): 41-51.
- [9] COLEMAN RA, HAYNES EB. Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture[J]. *J Lipid Res*, 1987, 28(11): 1335-1341.
- [10] MATORRAS R, PERTEAGUDO L, NIETO A, et al. Intrauterine growth retardation and plasma fatty acids in the mother and the fetus[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1994, 57(3): 189-193.
- [11] HERRERA E, ORTEGA-SENOVILLA H. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development[J]. *Clin Lipidol*, 2010, 5(6): 899-911.
- [12] BAARDMAN ME, KERSTJENS-FREDERIKSE WS, BERGER RM, et al. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights[J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(1): 24.
- [13] SOHI G, REVESZ A, HARDY DB. Permanent implications of intrauterine growth restriction on cholesterol homeostasis[J]. *Semin Reprod Med*, 2011, 29(3): 246-256.
- [14] EL-SAYYAD HI, AL-HAGGAR MM, EL-GHAWET HA, et al. Effect of maternal diabetes and hypercholesterolemia on fetal liver of albino Wistar rats[J]. *Nutrition*, 2014, 30(3): 326-336.
- [15] NAPOLI C, D'ARMIENTO FP, MANCINI FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11): 2680-2690.
- [16] PICONE O, LAIGRE P, FORTUN-LAMOTHE L, et al. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(2): 287-299.
- [17] WANG W, WU Z, DAI Z, et al. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(3): 463-477.

(编辑:董宇)