

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00184

黄芩素作用白假丝酵母菌的 GC-MS 代谢组学研究

吴海棠¹, 李祥², 王添琦¹, 陈啸飞¹, 曹颖瑛³, 朱臻宇^{1*}

1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

2. 解放军 62380 部队, 北京 100071

3. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 运用代谢组学方法对黄芩素作用白假丝酵母菌引起的胞内代谢差异进行表征, 寻找潜在的生物标志物并探讨相关的药物作用机制。**方法** 采用气相色谱-质谱方法测定黄芩素作用前后白假丝酵母菌胞内的代谢指纹谱, 利用多元统计分析方法比较黄芩素给药组与对照组的代谢物谱差异, 筛选出可能的潜在生物标志物, 并作出相关代谢途径的可能解释。**结果和结论** 经比较分析, 共筛选得到 20 个潜在生物标志物, 这些重要的差异代谢物主要参与了氨基酸代谢、三羧酸循环、磷脂代谢和氧化应激等相关通路。

[关键词] 代谢组学; 气相色谱-质谱法; 多元分析; 黄芩素; 白假丝酵母菌

[中图分类号] R 379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0184-06

GC-MS based metabolic analysis of baicalein-treated *Candida albicans*

WU Hai-tang¹, LI Xiang², WANG Tian-qi¹, CHEN Xiao-fei¹, CAO Ying-ying³, ZHU Zhen-yu^{1*}

1. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. No. 62380 Troop of PLA, Beijing 100071, China

3. New Drug R&D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To conduct a metabolic analysis of the intracellular metabolism in baicalein-treated *Candida albicans*, so as to search for possible biomarkers and to discuss the mechanism of baicalein. **Methods** GC-MS analysis was used to obtain the metabolic fingerprint of *C. albicans* before and after treatment with baicalein, and multivariate statistical analysis was used to identify the differences in intracellular metabolites between the treated and control groups, so as to search for the possible biomarkers and discuss the possible relevant metabolic pathways. **Results and conclusion** Twenty metabolites were screened out and selected as potential biomarkers, and they were primarily involved in oxidative stress, citrate cycle, lipid metabolism and amino acid metabolism.

[Key words] metabolomics; gas chromatography-mass spectrometry; multivariate analysis; baicalein; *Candida albicans*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):184-189]

白假丝酵母菌(*Candida albicans*)是一种常见的条件致病性真菌, 当机体免疫力功能低下时, 可导致口腔白假丝酵母菌病、阴道炎、真菌性鼻窦炎、外耳道炎等, 甚至引发危及生命的系统性白假丝酵母菌感染^[1]。目前用于白假丝酵母菌病治疗的药物主要有多烯类、氮唑类、棘白菌素类、烯丙胺类和核苷类似物。这些抗真菌药物虽然都已应用于临床, 但都存在相应的缺陷或毒副作用^[2]。因此, 寻找一种新的、安全有效的抗真菌药物就显得尤为重要。研究发现, 许多中药对包括白假丝酵母菌在内的微生

物具有抑制或杀灭的作用, 为白假丝酵母菌病的治疗提供了新的视角。

黄芩素(baicalein)又称黄芩苷元, 是唇形科植物黄芩的干燥根分离出的单体, 被广泛应用于中医临床。黄芩素具有抗氧化、神经保护、抗菌和抗病毒等生物活性^[3], 研究还表明黄芩素作用于白假丝酵母菌可引起其细胞程序性死亡^[1]。然而, 黄芩素的抗菌机制尚不明确, 对其抗菌机制进行研究对寻找新的、安全有效的抗真菌药物有一定参考作用。

代谢组学作为研究生物体系受到外部刺激所产

[收稿日期] 2012-12-16

[接受日期] 2013-01-15

[作者简介] 吴海棠, 硕士, E-mail: wht921@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871261-86, E-mail: zzyccy@yahoo.com.cn

生的所有代谢产物变化的学科, 通过关注代谢循环中小分子代谢物的变化, 揭示生物体在特定时间、环境下的整体功能状态^[5]。完整的代谢组学分析流程包括样品的制备、数据的采集、分析和解释。色谱、质谱、核磁共振、红外光谱、紫外吸收、放射性检测等分离分析手段及其组合都在代谢组学研究中得到应用。其中, 色谱以其高分离度、高通量, 质谱以其普适性、高灵敏度和特异性成为最主要的分析工具。同时, 信息学技术的不断发展, 也为代谢组学数据的解析提供了有效的方法。

本研究采用气相色谱-质谱(GC-MS)高通量仪器分析与数学解析相结合的代谢组学技术, 考察黄芩素作用前后白假丝酵母菌的代谢特征谱差异, 结合代谢通路数据库, 寻找与药物作用机制相关的代谢物和相应的代谢网络, 探讨相关的药物作用机制, 为研究新型抗真菌药物提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器 Thermo Trace Ultra/DSQ II GC/MS (Thermo Electron Corporation); BP211D 分析电子天平 (Sartorius); Biofuge stratos 高速冷冻离心机 (Heraeus); 微型旋涡混合仪 (Thermo); -80℃ 低温冰箱 (Thermo); 冻干机; 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂); MJx 型智能霉菌培养箱 (宁波江南仪器厂); SW-CT-IF 型超净化工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 移液器 (Gison 产品); FR-200 紫外与可见分析装置 (上海复日科技有限公司)。

1.2 试剂 甲氧基胺盐酸盐、N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺 (MSTFA)、吡啶 (GC 专用)、标准品均购自 Sigma 和上海晶纯公司。黄芩素购自中国食品药品检定研究院。

1.3 菌株与培养基 白假丝酵母菌 SC5314; 酵母氮碱 (YNB) 培养液: YNB 6.7 g, 葡萄糖 20 g, 加三蒸水 1 000 mL 溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装后于 4℃ 保存备用; 酵母浸出粉胨葡萄糖 (YPD) 培养液: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加三蒸水 1 000 mL 溶解, 高压灭菌 (121℃, 15 min) 后于 4℃ 保存备用。

1.4 真菌培养

1.4.1 黄芩素半数抑菌浓度 (IC₅₀) 的确定 从平板上挑取白假丝酵母菌单克隆, 接种至 1 mL YPD 培养液, 于 30℃、200 转/分振荡培养至对数生长后期, 于紫外可见分光光度计 600 nm 处^[6-7]测菌液光密度

(D) 值, 以 YNB 培养液稀释并调整菌液浓度至 D 值为 0.1, 培养至 D 值为 0.2 时, 将黄芩素从 64 μg/mL 起按浓度梯度依次加入各锥形瓶中, 继续培养 [在对照组中加入相同体积的二甲基亚砷 (DMSO), DMSO 的浓度应小于 0.05%, 以确保对白假丝酵母菌的生长没有影响], 分别在 3、4、5、6 h 测定样品的 D 值。和对照组的比较后, 选择继续培养 4 h 的方案, 其中黄芩素的 IC₅₀ 为 32 μg/mL。

1.4.2 培养条件 按照测定 IC₅₀ 的方法和最终确定的给药量, 平行培养黄芩素给药组和对照组各 6 份以备用。

1.5 样品前处理

1.5.1 提取 往锥形瓶中加入 20 mL 60% 甲醇溶液 (预冷 -20℃) 后, 迅速混匀, 放入 -40℃ 冰箱 5 min, 取出后, 3 300×g 离心^[8]。将离心后的给药组和对照菌体用超纯水迅速清洗后, 用 1 mL 沸水 (含 10 μL 200 mmol/L 的 α-氨基丁酸内标)^[9-11] 重悬, 保持 15 min, 后放入 -80℃ 冰箱冰冻 15 min, 取出, 60℃ 水浴溶解, 再重复冻融操作 2 次后, 16 100×g 离心收集上清液, 将上清液过滤后保存在玻璃小瓶中, 放置于 -20℃ 冰箱预冻。后将样品转移至冻干机中冻干, 获得细胞提取液的冻干粉。

1.5.2 衍生化 在装有冻干粉的玻璃小瓶中加入 75 μL 甲氧基胺盐酸盐/吡啶溶液, 于 40℃ 温孵 90 min, 再加入 75 μL MSTFA 溶液 (1% 催化剂), 于 40℃ 温孵 50 min, 16 100×g 离心取上清, 装入进样小瓶, 备用。

1.5.3 菌体干质量的测定 将 1.5.1 项下所得沉淀在室温下风干后, 称量样品干质量。至少要进行 3 次称量以确保样品完全干燥。

1.6 GC-MS 条件 毛细管柱为 HP-5MS 石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度: 260℃。升温程序: 起始温度 70℃, 保持 3 min, 4℃/min 升至 220℃, 再 8℃/min 升至 310℃ 并保持 10 min, 图谱从第 8 分钟开始采集, 采集到第 52 分钟, 载气: 高纯氮气, 流速 1.0 mL/min。不分流, 进样量 1 μL。

电子轰击源 (EI); 离子源温度: 200℃; 接口温度: 280℃; 电子能量: 70 eV; 调谐方式: 标准调谐; 质谱扫描方式: 全部扫描范围 15~800 amu (原子质量单位)。Xculibur 数据处理系统。

1.7 数据处理 得到 GC-MS 指纹图谱后, 我们使用仪器自带软件对数据进行整理、收集和预处理, 将原始数据 (.RAW) 均转化成 CDF 格式, 转化后的数

据进一步通过 XCMS 进行峰校正和峰积分并采用 MATLAB 7.0(The MathWorks, Inc., USA)对离子峰进行过滤,仅保留在相同保留时间下峰度最大的离子峰。同时,为校正质谱响应,每个样品的各个峰面积除以各自的细胞干质量,在此基础上,再将得到的数据除以相应衍生化后内标的峰度最大的离子峰(m/z 130.08)。将处理好的数据导入到SIMCA-P V 11.0(Umetrics, Sweden)软件,标准化后进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法(PLS-DA)分析,运用 variable influence in the projection (VIP)方法来预测各个代谢物对模型的贡献值。VIP 大于 1 的数据作为对模型具有明显贡献的数据,即可能的潜在

标志物。接着再采用 one-way ANOVA 的方法,剔除 P 值 ≥ 0.05 的数据后,得到有意义的变量。通过这一系列步骤之后,将有意义的数据与 GC-MS 自带的 NIST 数据库匹配结合,并用标准品进行定位后,最终得到潜在的生物标志物。

2 结果

2.1 GC-MS 色谱图 分别平行培养 6 组黄芩素给药组和对照组白假丝酵母菌,经提取后,将胞内代谢物进行衍生化后进样分析,得到 GC-MS 色谱图,如图 1 所示。

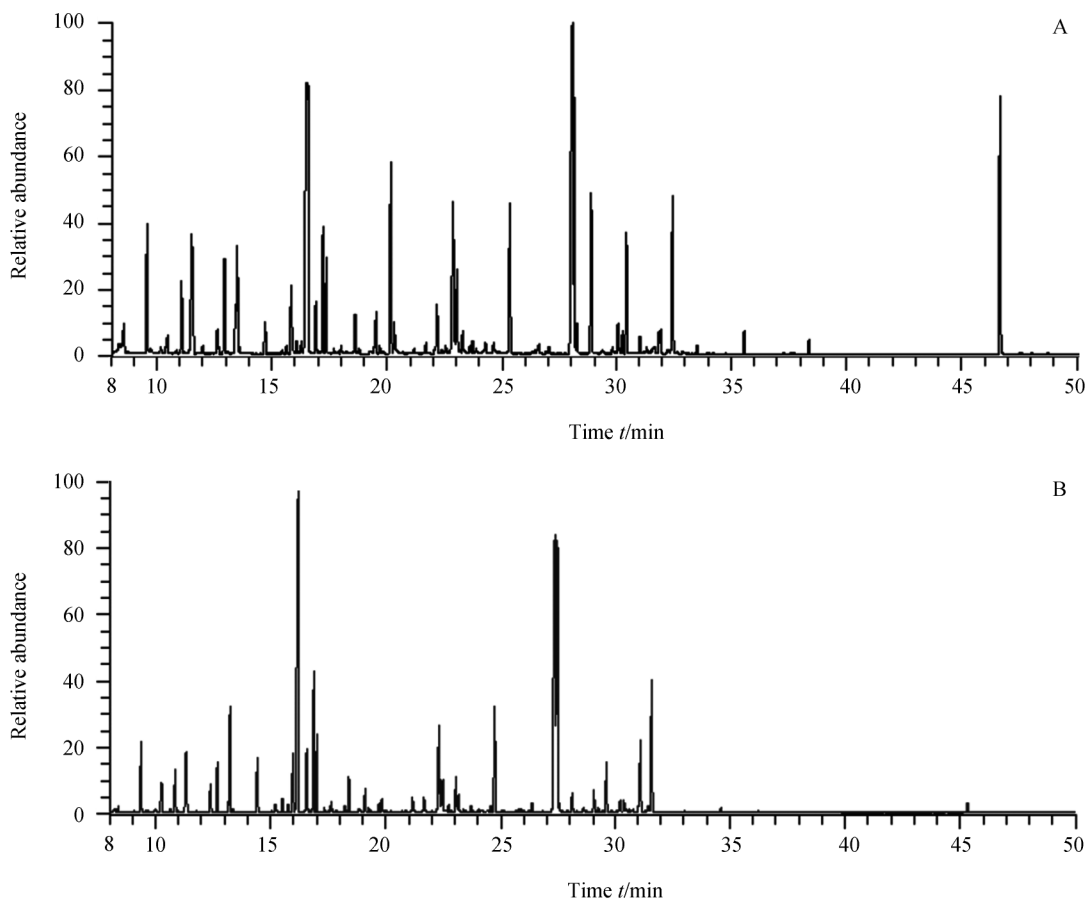


图 1 黄芩素给药组(A)和对照组(B)的典型 GC-MS 色谱图

Fig 1 Typical GC-MS chromatograms of *C. albicans* in baicalein-treated group (A) and control group (B)

2.2 PCA 与 PLS-DA 结果 数据校正后,首先对黄芩素给药组和对照组进行了无监督模式的 PCA,其得分如图 2A 所示。结果显示黄芩素给药组和对照组可以获得良好的分离,表明给药后白假丝酵母菌的胞内代谢发生了较为明显的变化。为了区别更多的离子峰,又进行了 PLS-DA,其得分图和载荷图

如图 2B 和 2C 所示。同样,在 PLS-DA 得分图中,黄芩素给药组和对照组也获得了明显的区分。相应的载荷图用于筛选潜在的生物标志物。共筛选得到 20 个潜在的生物标志物,包括给药组中含量较高的丙氨酸、磷酸、甘油、丝氨酸、苏氨酸、苹果酸、脯氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、鸟

氨酸、柠檬酸、肌醇和海藻糖, 以及在对照组中含量较高的乳酸、缬氨酸、异亮氨酸、甘氨酸和阿拉伯糖

醇。黄芩素给药组和对照组代谢物的含量变化热图见图 3。

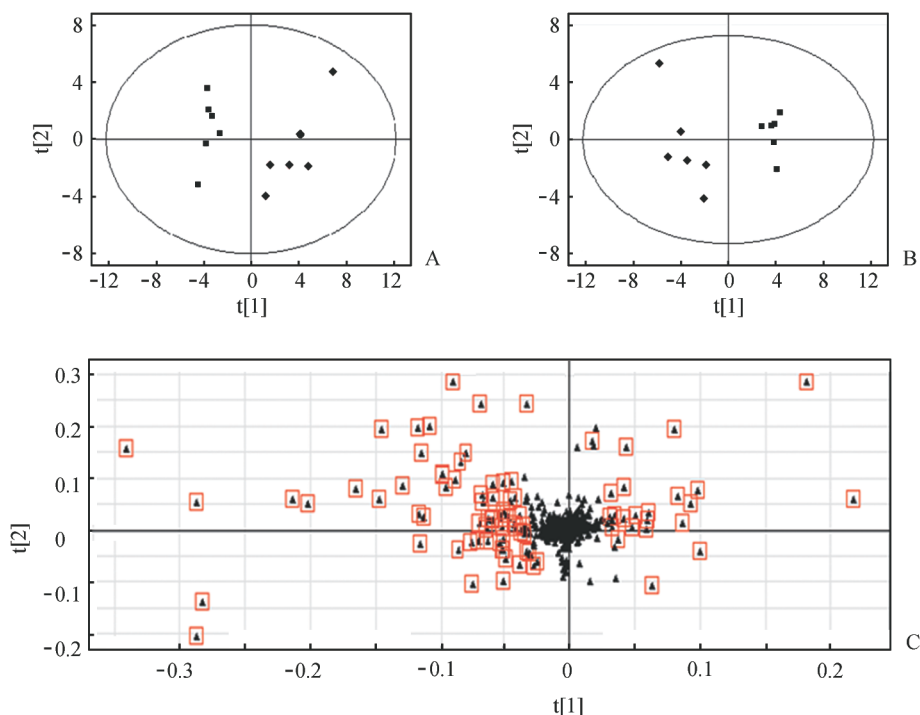


图 2 黄芩素给药组和对照组胞内代谢物的主成分分析得分图(A)、偏最小二乘法得分图(B)和载荷图(C)

Fig 2 Principal components analysis (A), partial least squares discrimination analysis score plot (B) and loading plot (C) of baicalein in drug-treated and control groups

A,B: ■: Control group; ◆: Baicalein-treated group; C: Significant variables of variable influence in the projection were marked in the red square

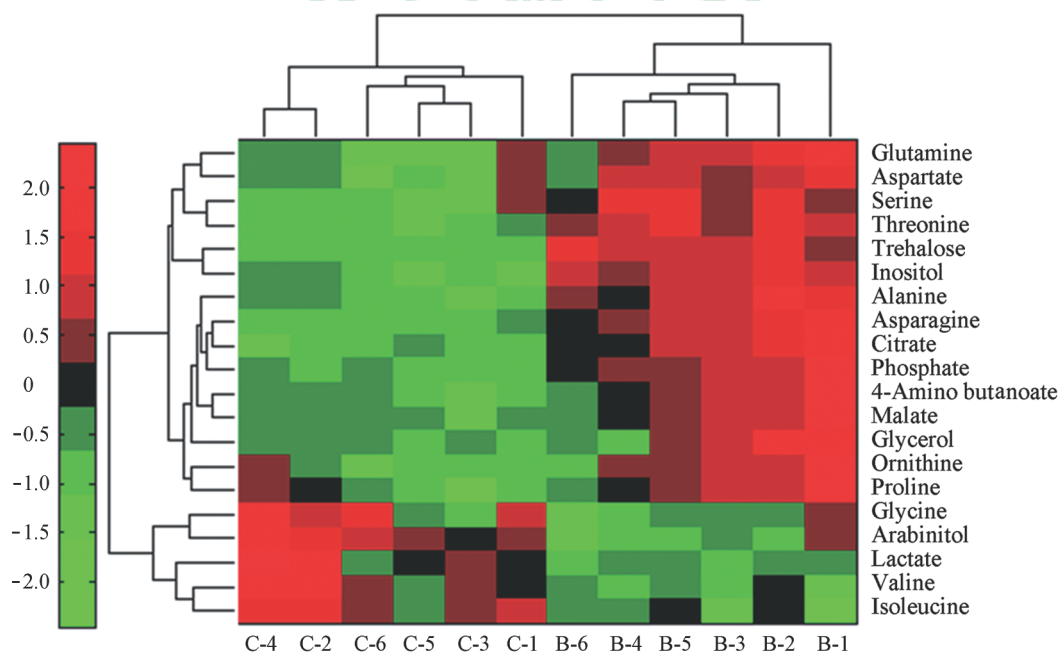


图 3 黄芩素给药组和对照组中胞内差异代谢物的代谢差异热图

Fig 3 Heat map of the differential metabolites in baicalein-treated and control groups

C: Control group; B: Baicalein-treated group. Red indicates increased levels of metabolites; Green indicates decreased levels of metabolites

3 讨论

3.1 海藻糖 海藻糖是一种非还原性二糖,它仅能在细菌、真菌、植物和无脊椎动物体内合成,在哺乳动物体内无法合成。目前认为机体受到有害的外界环境(如面临高温、高压、饥饿等)胁迫时,细胞内的海藻糖能够通过稳定蛋白和生物膜来对外界刺激起到抵抗防御的作用,从而使得机体快速适应外界环境^[12-13]。在本实验中,黄芩素给药组中胞内海藻糖的浓度要高于对照组,这可能是黄芩素给药后给白假丝酵母菌造成了外界刺激,使得胞内海藻糖大量积累,从而对外界的刺激进行应答,起到抗氧化、抗压的作用。

3.2 氨基酸类 在黄芩素给药组与对照组中,许多氨基酸含量都有显著性差异。除异亮氨酸、缬氨酸和甘氨酸在给药组中降低外,其余9种氨基酸——丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、鸟氨酸在给药组中都是增加的。氨基酸是生物体中重要的碳源和氮源,是蛋白质和核苷酸的前体物质,并在生物体内参与了蛋白质和核苷酸的合成^[14-15]。因此,丙氨酸等绝大部分氨基酸在给药组中含量升高,可能是由于白假丝酵母菌中的蛋白质合成受到抑制,特别是与生长和致病性相关的蛋白。

3.3 三羧酸循环 三羧酸循环是生物体内有氧氧化生成能量的一个重要过程。在真核细胞中,三羧酸循环在线粒体机制中进行。本实验中,三羧酸循

环中2个重要中间产物苹果酸和柠檬酸在给药后均上升;而乳酸作为三羧酸循环的间接前体物质,给药后含量下降。这一结果与 Hoehamer 等^[6]的研究相符,他们的研究发现白假丝酵母菌在受到多种药物、重金属或者巨噬细胞作用刺激后,都可以造成胞内三羧酸循环相关蛋白含量的上升,表明为了适应外界不利环境,菌体需要更多的能量以应对这种压力。这表明黄芩素给药后三羧酸循环代谢的增强源于菌体对药物刺激的应答。

3.4 甘油、磷酸、肌醇 磷脂是构成细胞膜的重要成分,磷脂的合成对细胞生长有重要影响^[16]。在本研究中,甘油和磷酸这2个磷脂的主要成分在给药组中含量都升高。肌醇是磷酸甘露聚糖的前体,而磷脂甘露聚糖是白假丝酵母菌细胞表面的一种结合糖基磷脂酰肌醇的糖脂,与白假丝酵母菌的致病性相关^[17],其含量在给药组中也升高。这表明黄芩素可能通过影响细胞膜功能从而起到治疗作用。此外,Ding 等^[18]研究还发现,在厌氧条件下,胞内肌醇与海藻糖呈相同的变化趋势,表明肌醇也作为一种应激产物起到抗压作用。

总之,本研究首次应用代谢组学方法对黄芩素作用白假丝酵母菌的差异代谢物进行研究,经比较分析,共得到20个差异代谢物,这些重要的差异代谢物主要参与了氨基酸代谢、三羧酸循环、磷脂代谢和应激反应等相关通路,其代谢通路图如图4所示。本研究为阐明黄芩素作用白假丝酵母菌的复杂机制提供了参考,也为抗菌药物的开发提供了思路。

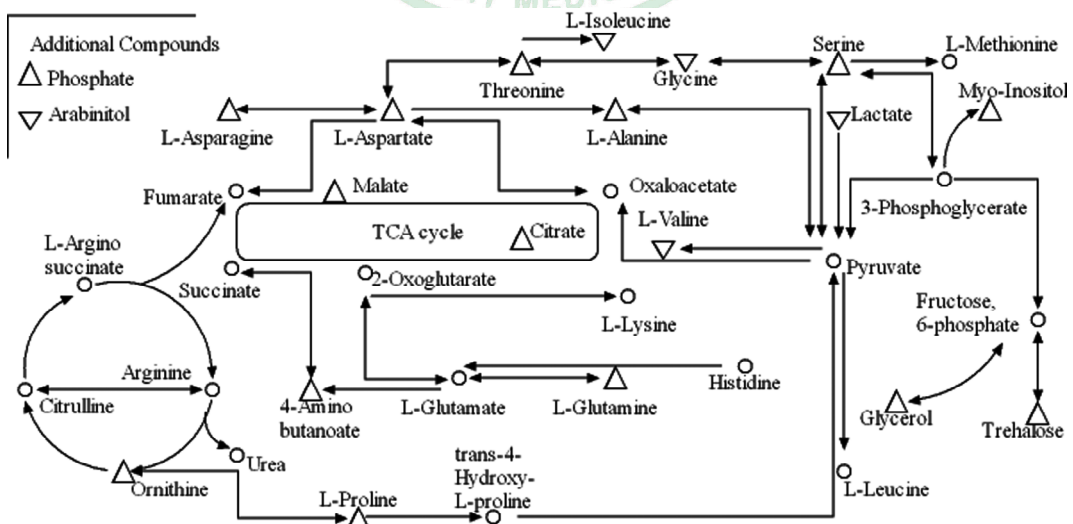


图4 黄芩素给药组和对照组差异代谢物代谢网络

Fig 4 Schematic overview of potential biomarkers in baicalein and control group

Δ represent metabolites at a high level in baicalein group; ∇ represent metabolites at a high level in control group. TAC cycle: Citric acid cycle

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Netea M G, Brown G D, Kullberg B J, Gow N A R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 67-78.
- [2] Calugi C, Trabocchi A, Guarna A. Novel small molecules for the treatment of infections caused by *Candida albicans* a patent review (2002-2010)[J]. *Expert Opin Ther Patents*, 2011, 21: 381-397.
- [3] Cao Y, Dai B, Wang Y, Huang S, Xu Y, Cao Y, et al. *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32: 73-77.
- [4] Bao D D, Cao Y Y, Huang S, Xu Y G, Gao P H, Wang Y, et al. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19: 803-809.
- [5] 夏建飞, 梁琼麟, 胡 坪, 王义明, 罗国安. 代谢组学研究策略与方法的新进展[J]. *分析化学*, 2009, 37: 136-143.
- [6] Hoehamer C F, Cummings E D, Hilliard G M, Rogers P D. Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 1655-1664.
- [7] Liu T T, Lee R E B, Barker K S, Lee R E, Wei L, Homayouni R, et al. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 2226-2236.
- [8] Villas-Bôas S G, Højer-Pedersen J, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast; evaluation of sample preparation methods[J]. *Yeast*, 2005, 22: 1155-1169.
- [9] Bolten C J, Wittmann C. Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1993-2000.
- [10] Canelas A B, ten Pierick A, Ras C, Seifar R M, van Dam J C, van Gulik W M, et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics[J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 7379-7389.
- [11] Hiller J, Franco-Lara E, Weuster-Botz D. Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations; evaluation of extraction and metabolite analysis procedures[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1169-1178.
- [12] Qiao C, Jia S, Dai Y, Wang R, Sun A. Trehalose biosynthesis enhancement for six yeast strains under pressurized culture[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 160: 613-620.
- [13] Li H, Wang H L, Du J, Du G, Zhan J C, Huang W D. Trehalose protects wine yeast against oxidation under thermal stress[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 26: 969-976.
- [14] Fleck C B, Schobel F, Brock M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization[J]. *Int J Med Microbiol*, 2011, 301: 400-407.
- [15] Rajam B, Rajam M V. Inhibition of polyamine biosynthesis and growth in plant pathogenic fungi *in vitro* [J]. *Mycopathologia*, 1996, 133: 95-103.
- [16] Klig L S, Friedli L, Schmid E. Phospholipid Biosynthesis in *Candida albicans*: regulation by the precursors inositol and choline[J]. *J Bacteriol*, 2009, 172: 4407-4414.
- [17] Chen Y L, Kauffman S, Reynolds T B. *Candida albicans* uses multiple mechanisms to acquire the essential metabolite inositol during infection[J]. *Infect Immun*, 2008, 76: 2793-2801.
- [18] Ding M Z, Zhou X, Yuan Y J. Metabolome profiling reveals adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* during repeated vacuum fermentations [J]. *Metabolomics*, 2009, 6: 42-55.

[本文编辑] 尹 茶