

大鼠口服龙胆水煎剂后尿液代谢谱的变化

徐 斌, 赵毅民*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 观察大鼠灌胃给予龙胆水煎剂(RGD)后其尿液代谢谱的变化及其与龙胆寒性作用的相关性。**方法** 10只雌性Wistar大鼠分为对照组(ig生理盐水)和RGD组(ig RGD 40 g·kg⁻¹·d⁻¹, 共9 d)。从给药前3 d开始每3 d检测1次体重、体温、食量和饮水量。于d 5收集大鼠尿样,测定核磁共振氢谱([¹H]NMR)。给药结束d 2称体重,测定血浆中环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)含量,取肝、肾、脾和胸腺等脏器称重并计算脏器指数。**结果** 与对照组比较,从给药d 3开始RGD组大鼠毛脏且色泽差,腹泻,体温降低,活动减少,受激排便增多,但食量和饮水量无明显变化。RGD组大鼠肝、肾、脾和胸腺等脏器指数及血浆cAMP/cGMP比值无明显变化。尿样[¹H]NMR数据分析表明,RGD组与对照组在主成分分析得分图中呈聚类型分布,两组间未见重叠,RGD组尿样中葡萄糖、氨基酸、2-羧基戊二酸、柠檬酸盐和琥珀酸盐明显增加,牛磺酸、氮氧三甲胺、肌酸酐和十二烷酸酯类等明显减少。**结论** 长时间给予较大剂量RGD可使大鼠出现虚寒证体征,给药后尿液[¹H]NMR谱变化与龙胆寒性作用相关,主要表现为三羧酸循环能量代谢、脂肪酸代谢以及能量保存和利用功能明显降低。**关键词:** 龙胆; 代谢组学; 磁共振波谱学; 模式识别

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)03-0221-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.03.011

收稿日期: 2007-12-14 接受日期: 2008-03-25

作者简介: 徐 斌(1981-),男,河北省邯郸人,硕士研究生,主要从事中药代谢组学研究;赵毅民(1952-),男,山东省青州人,研究员,主要从事天然产物的化学和生物活性评价研究。

*联系作者 E-mail: zhaoyim@bmi.ac.cn Tel: (010) 66931648

代谢组学(metabonomics/metabolomics)研究可通过观察生物样品中所有可测代谢物的综合表现,探讨内因或外因引起的生物体内的生理、生化变化及其生物学意义^[1],通常采用现代分析测定方法如核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和质谱(mass spectroscopy, MS)以大样本的数据采集和大规模的计算为特征,在中药研究领域主要应用于药物代谢、药物毒性筛选和作用机制研究^[2-5]。我国传统中医药辨证施治强调的是整体观,代谢组学反映的是外源性物质(化学物质和中药等)对生物机体所产生的整体效应,这在方法论上与中医有相似之处。因此,代谢组学有可能在研究中药的生物学效应和作用机制方面发挥作用。

龙胆(Radix Gentianae)是一种较常用的中药,取材为龙胆科植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆(*G. scabra* Bge.)、三花龙胆(*G. triflora* Pall.)或坚龙胆(*G. rigescens* Franch.)的根及根茎,别名胆草、苦胆草或龙胆草,味苦,性寒,能清热燥湿,泻肝胆火。根及根茎含龙胆苦苷(gentiopicroside)约2%、龙胆碱(gentianine)约0.05%及龙胆糖(gentianose)约4%。龙胆临床常用于治疗肝炎,成方有龙胆泻肝汤和苦味健胃剂^[6-7]。现代实验药理学研究表明,龙胆有健胃、抗肿瘤、抗菌和减慢心率等作用^[8-9]。目前,国内外尚未见应用代谢组学研究服用龙胆后尿液代谢谱的报道。本研究应用代谢组学观察大鼠口服龙胆水煎剂(Radix Gentianae decoction, RGD)后尿液代谢谱的改变,为探讨龙胆的药理学作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

Wistar大鼠,♀,体重240~260 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号: SCXK(京)2007-2010。大鼠自由摄食饮水,饲养室

光照 12 h, 黑暗 12 h, 室温为 25 ~ 27°C, 相对湿度 35% ~ 75%。生药龙胆购自北京同仁堂科技有限公司, 批号为 6030075, 经鉴定为 *Gentiana scabra* Bge.。龙胆苦苷和獐牙菜苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110785-200203 和 110770-200611; 马钱苷对照品由本实验室自制, 经 HPLC-DAD 归一化法检测纯度在 98% 以上(检测波长为 260 nm)。重水(D₂O)购自北京京巨化工科贸有限责任公司, 3-(三甲基硅烷基)丙酸钠-2, 2, 3, -3-D(4)[2, 2, 3, 3-D(4)-3-(trimethylsilyl) propionic acid sodium salt, TSP] 购自加拿大默克公司。Varian UNITYINOVA 600 型超导傅立叶变换 NMR 仪购自美国 Varian 公司。SN-682 型微机多探头 γ 射线闪烁计数仪购自中国科学院上海原子核研究所。API 3000 三重四极杆液相-质谱-质谱联用谱仪(配有 Turbo Ionspray 离子源及 Analyst 1.1 数据处理系统)购自美国应用生物系统公司。Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器购自美国安捷伦科技有限公司。

1.2 RGD 的制备及化学成分鉴定

参照常规中药水煎剂制备方法, 取龙胆药材 1 kg, 以 5 L 蒸馏水回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并提取液, 经减压浓缩至 0.5 L, 得到 RGD, 生药含量相当于 2 kg·L⁻¹。应用液质联用(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 检测、并通过多反应检测(multi-reaction monitor, MRM) 质谱扫描方式对 RGD 中 3 种主要成分龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和马钱苷进行定量分析^[10]。

1.3 动物分组、给药和样品采集

10 只大鼠, 随机平均分为对照组(ig 生理盐水)和 RGD 组(ig RGD 40 g·kg⁻¹·d⁻¹, 每天 1 次, 连续 9 d)。在从给药前 3 d 开始每 3 d 测量一次体重、体温、食量和饮水量。在 d 5, 用代谢笼收集 8:00 a. m. ~ 4:00 p. m. 8 h 尿液, -20°C 冻存。给药结束后 d 2, 禁食不禁水 10 h, 每只大鼠游泳 5 min (作为负荷), 摘眼球取血, 颈椎脱臼处死, 取肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺和卵巢称重, 计算脏器指数[脏器重量(g) × 1000/动物体重(g)]。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数用 SAS 软件 *t* 检验进行统计学分析。

1.4 血浆 cAMP 和 cGMP 含量测定

将大鼠麻醉后摘眼球取血, 柠檬酸钠抗凝, 3000 × g 离心 15 min, 收集血浆, 应用放射免疫分析

方法^[9]测定血浆中 cAMP 及 cGMP 的含量。用 SAS 软件 *t* 检验进行组间均数比较。

1.5 尿液样品的处理

尿液样品于 4°C, 3000 × g 离心 10 min, 取上清液加入 1:1 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄ 0.4 mol·L⁻¹, NaH₂PO₄ 0.4 mol·L⁻¹, pH 7.4), 静置 10 min。再于 4°C, 13 000 × g 离心 10 min, 取上清液加入 TSP(1 mmol·L⁻¹), 用 Varian UNITYINOVA 600 型超导傅立叶变换 NMR 仪进行测量。

1.6 NMR 数据采集和分析

在超导傅立叶变换 NMR 仪上调用 NOE 相关 2D-NMR 谱(nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY) 脉冲序列, 采用预饱和方式抑制水峰, 饱和时间为 2 s, 混合时间 0.15 s。谱宽 7000 Hz, 采样点数 64 k, 叠加次数 128 次, 饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减(free induction decay, FID) 信号经过 32 k 傅立叶变换转为 NOESY。以 TSP 为化学位移参考峰的位置, 设为 0 ppm。调用 Varian NMR 应用软件(Varian's NMR application software package, VNMR) 中的程序将 [¹H] NMR 谱按默认值, 从 9.5 ppm 到 0.5 ppm, 每段为 0.04 ppm, 把水峰、胺类活性氢所在的位移 4.5 ~ 6.2 ppm 去除进行分段并积分。将积分数据归一化之后, 以文本文件或 Excel 文件贮存, 用于主成分(principal components, PC) 分析。

1.7 主成分分析

将积分值进行中心化和比例换算, 用 Unscrambler 9.6 (CAMO, USA) 软件进行 PC 分析^[11], 求出 PC, 根据 PC 对两组大鼠尿液进行代谢组分析。

2 结果

2.1 RGD 中主要化学成分测定

应用 LC/MS/MS 检测方法对 RGD 中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和马钱苷 3 种主要成分进行了含量测定。LC/MS/MS 检测方法对 2005 版药典(一部)中龙胆项下龙胆苦苷含量 HPLC 测定方法进行了改进, 将紫外检测器改为质谱检测器, 提高了方法的灵敏度与被测物的检出限, 因此本方法不仅可以准确测定龙胆苦苷含量, 而且含量较低的獐牙菜苦苷和马钱苷成分也得到了较好的分析。测定结果表明, RGD 中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和马钱苷的含量分别为 12.52 g·L⁻¹, 7.30 和 8.84 mg·L⁻¹。

2.2 大鼠口服 RGD 后外观、体重、体温、食量及饮水量的变化

给药 d 0~2, 2 组大鼠外观无明显差异; d 3 RGD 组 3 只大鼠出现大便湿、软、溏, 肛脏, 其他外观无明显改变; d 5 RGD 组全部大鼠出现腹泻, 毛色较对照组差, 毛脏枯, 精神萎靡, 卷缩, 倦怠乏力, 测体温时受激排便明显多于对照组, 并逐渐加重; d 8 腹泻逐渐减少, 甚至无明显腹泻。大鼠体温在实验前无明显差别, 从给药后 d 3 开始 RGD 组体温明显低于对照组, 体重、食量和饮水量无明显变化(表 1, 表 2)。

2.3 大鼠口服 RGD 后脏器指数的变化

给药结束后 d 2, 颈椎脱臼处死大鼠, 取肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺和卵巢称重, 并计算脏器指数, RGD 组与对照组比较无明显变化(表 3)。

2.4 大鼠口服 RGD 后血浆 cAMP 和 cGMP 含量的变化

由表 4 可见, RGD 组与对照组比较, 血浆 cAMP

和 cGMP 含量及 cAMP/cGMP 比值无明显变化。

2.5 $[^1\text{H}]$ NMR 图谱及模式识别分析

RGD 组和对照组大鼠尿液的典型 $[^1\text{H}]$ NMR 谱如图 1 所示, 10 只大鼠 $[^1\text{H}]$ NMR 谱的波峰积分值的 PC 分析结果见图 2 和图 3。由图 2 可见, RGD 组与对照组间无明显交叉和重叠, RGD 组集中分布在右方, 而对照组分布在左方, 且在 PC2 方向上呈现一定程度的分离。对 $[^1\text{H}]$ NMR 谱变化值影响最大的 2 个 PC 的贡献率分别为 80% (PC1) 和 8% (PC2)。结合图 3 对 PC1 和 PC2 进一步分析表明, 与对照组相比, RGD 组大鼠尿液中葡萄糖和氨基酸 (3.94 ~ 3.46 ppm)、2-羧基戊二酸 (3.02, 2.46 ppm)、柠檬酸 (2.54, 2.66 ppm) 和琥珀酸盐 (2.42 ppm) 谱峰相对积分面积明显增高, 而牛磺酸 (3.42, 3.30 ppm)、氮氧三甲胺 (3.26 ppm)、肌酸酐 (4.06, 3.06 ppm) 和十二烷酸酯类等 (1.54, 1.30 ppm) 的谱峰相对积分面积明显下降。

Tab 1. Changes of body weight and temperature of rats after oral administration of Radix Gentianae decoction (RGD)

Group	Body weight/g				Body temperature/°C			
	d 0	d 3	d 6	d 9	d 0	d 3	d 6	d 9
Control	194.4 ± 5.1	203.3 ± 11.9	207.8 ± 12.1	212.3 ± 10.9	37.1 ± 0.7	37.2 ± 0.8	37.1 ± 0.4	37.2 ± 0.5
RGD	195.9 ± 6.7	209.7 ± 7.2	217.6 ± 12.2	227.0 ± 10.5	37.5 ± 0.3	36.0 ± 0.5*	35.9 ± 0.5**	36.5 ± 0.4*

The rats of RGD group were ig RGD 40 g·kg⁻¹·d⁻¹ for 9 d. The control group was ig normal saline. The body weight and temperature were measured on d 0, 3, 6 and 9, respectively, after RGD administration. $\bar{x} \pm s$, n = 5. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control group.

Tab 2. Changes of diet and water intake of rats after oral administration of RGD

Group	Diet intake/g				Water intake/mL			
	d-2-0	d 1-3	d 4-6	d 7-9	d-2-0	d 1-3	d 4-6	d 7-9
Control	18.1 ± 1.7	17.9 ± 1.3	17.5 ± 1.6	18.2 ± 1.2	37.9 ± 10.0	31.8 ± 6.7	34.8 ± 3.0	37.3 ± 4.6
RGD	18.2 ± 1.5	16.6 ± 2.9	17.8 ± 3.3	18.4 ± 3.9	37.9 ± 10.2	38.2 ± 9.0	46.3 ± 7.2	40.9 ± 9.9

See Tab 1 for rat treatments. The data were the means of diet or water intake during the indicated 3 d. d-2; d 3 before RGD administration. $\bar{x} \pm s$, n = 5. No statistical significance between RGD and control groups.

Tab 3. Changes of organ indexes of rats after oral administration of RGD

Group	Organ index					
	Thymus	Spleen	Liver	Kidneys	Adrenals	Ovaries
Control	1.94 ± 0.35	2.56 ± 0.47	36.48 ± 4.36	8.36 ± 0.47	0.49 ± 0.05	0.77 ± 0.07
RGD	1.95 ± 3.66	2.68 ± 0.39	40.15 ± 5.86	8.78 ± 0.49	0.47 ± 0.05	0.71 ± 0.14

See Tab 1 for rat treatments. Organ index = organ weight (g) × 1000/body weight (g). $\bar{x} \pm s$, n = 5. No statistical significance between RGD and control groups.

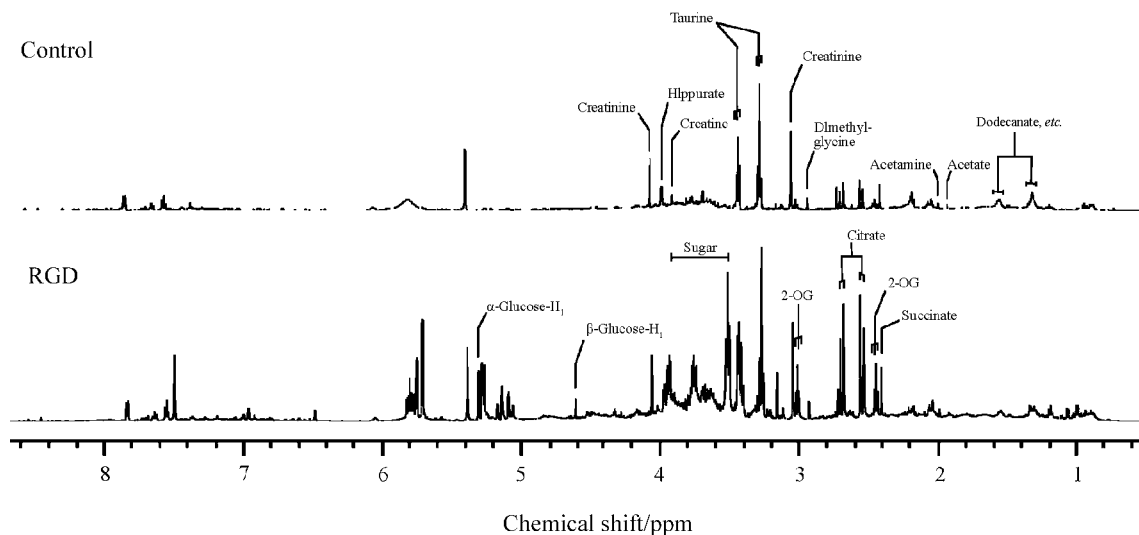


Fig 1. 600 MHz $[^1\text{H}]$ NMR spectra from rat urine of RGD and control groups. See Tab 1 for rat treatments. The rat urine was collected on d 5 after RGD administration.

Tab 4. Changes of cAMP and cGMP levels in rat plasma after oral administration of RGD

Group	cAMP/ $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	cGMP/ $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	cAMP: cGMP
Control	79.7 ± 18.5	1.90 ± 0.15	41.6 ± 6.4
RGD	61.4 ± 3.7	1.76 ± 0.15	35.1 ± 3.8

See Tab 1 for rat treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. No statistical significance between RGD and control groups.

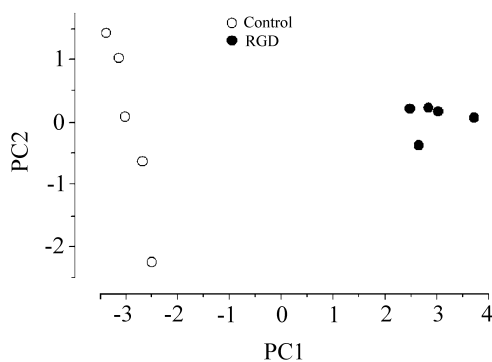


Fig 2. Scores scattering plot for urinary spectra of rats in RGD and control groups following principal component (PC) analysis.

3 讨论

由于中药成分复杂,其药效作用往往是多种化学成分在不同靶点上生物效应的综合表现,因此,通常以特定药物靶点为评价指标的药理学评价方法,在中药的生物效应评价中有一定的局限性。本研究

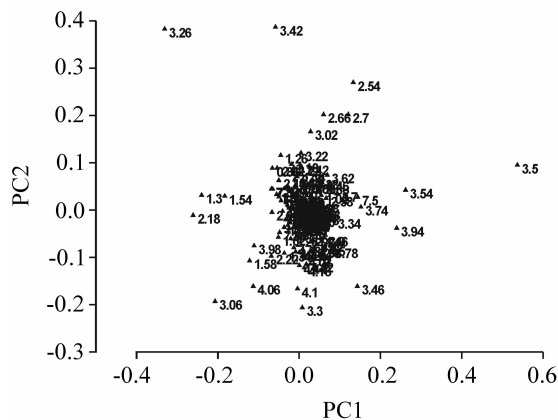


Fig 3. Loadings plot of PC analysis (PC1 vs PC2) for metabolites.

应用代谢物组学方法,分析了大鼠口服 RGD 后尿液代谢谱的改变,为研究龙胆多种有效成分在多靶点上的综合生物学效应及其机制奠定基础。

梁月华教授等^[13]经多次实验表明,给大鼠 ig 龙胆:知母:石膏:黄柏(质量比 1.2:1.5:2:1)复方水煎剂 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 20 d 可制备虚寒证大鼠模型。因为仅观察大鼠口服单味药龙胆后尿液代谢谱的变化,本研究加大了龙胆造模用药剂量,即 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,相当于该模型用量的 6 倍。另外,在预实验中发现,由于龙胆剂量增大,大鼠出现明显虚寒体征的时间提前,因此本研究将给药时间缩短为 9 d。研究结果表明,改进后的造模方法比较成功,给予 RGD $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 9 d 后大鼠出现虚寒症

状,如体温降低,活动减少,腹泻严重,受激排便增多。龙胆不是直接泻下中药,但大鼠出现明显腹泻,有可能是因为寒凉过度所致。一般认为虚寒证的动物模型由于机体副交感神经-M受体-cGMP系统的功能亢进而导致cAMP/cGMP比值降低^[12-13],本研究并未发现该比值有明显改变。给药d7~8大鼠腹泻症状明显改善,表明大鼠对龙胆的寒凉作用具有一定的耐受性。一般情况下,虚证动物体重与食量均有不同程度的减少,本研究没有发现其明显改变,这可能与龙胆的健胃作用有关。肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胸腺和卵巢指数均无显著差异,提示长期大量给予龙胆并未对大鼠造成严重的脏器损伤。

对大鼠尿液^[1H]NMR谱PC分析表明,RGD组与对照组在得分图中呈聚类分布,两组间未见重叠,表明两组尿液的代谢谱存在显著性差异。经PC分析得到以下代谢标记物:葡萄糖、氨基酸、2-羧基戊二酸、柠檬酸、琥珀酸盐、牛磺酸、氮氧三甲胺、肌酸酐和十二烷酸酯类等。分析这些有显著差异的内源性代谢产物有利于探讨龙胆药理作用的潜在机制。柠檬酸、2-羧基戊二酸和琥珀酸均与三羧酸循环能量代谢及糖酵解途径密切相关,这些内源性代谢中间产物含量的增加提示能量代谢过程受到抑制和糖酵解途径受阻^[14]。大鼠尿液^[1H]NMR谱中葡萄糖和部分氨基酸区域的信号显著增加,推测可能是由于机体对糖和蛋白质等营养物质的摄取利用不足所造成的。牛磺酸是胆汁酸盐的重要组成部分,后者参与脂肪的消化过程,它的减少说明脂肪代谢过程受到抑制;十二烷酸酯类等含量的减少同样提示脂肪代谢被抑制^[15]。氮氧三甲胺作为电子受体,其还原降解反应参与胞内呼吸链电子转移及能量保存过程;肌酸酐在体内起到储能和供能的作用,它们的减少表明能量代谢被抑制。上述变化均与大鼠活动减少相符。综上结果,大鼠体内糖酵解和脂肪降解受阻,糖类营养物质的代谢利用和能量保存等功能下降,表明龙胆具有降低机体能量代谢的作用,这与中医理论中龙胆寒性药材的“阴盛阳虚则寒”相符合。另外,在PC分析得分图上可以看到对照组5只大鼠在PC2方向上呈离散状态,提示PC2主要代表了大鼠之间的个体差异,而PC1则反映了给药组与对照组之间的代谢差异。

本研究表明,较大剂量的寒性中药龙胆,可造成大鼠寒性体征,并引起其尿液中代谢成分的明显变化。代谢组学分析显示,龙胆的寒性作用可能是通

过降低大鼠糖和脂肪代谢造成的。这一结果提示代谢组学方法可在一定程度上揭示中药在动物体内的整体效应,有可能为探讨和解决中药多成分、多靶点的药理作用机制提供一条新的研究途径。

致谢:感谢国家生物医学分析中心张琪老师和颜贤忠教授帮助核磁共振图谱测试;感谢上海中医药大学核医学实验室匡兴伟老师协助放射免疫分析测试。

4 参考文献:

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, **29**(11):1181-1189.
- [2] Liu CX. Significance of metabonomics in modern research of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, **35**(6):601-605.
- [3] Chen M, Zhao L, Jia W. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model [J]. *J Proteome Res*, 2005, **4**(6):2391-2396.
- [4] Huang YR, Wei GL, Long H, Xiao SH, Wang SF, Liu CX. Pharmacodynamics and its biochemical mechanism of Uncaria-stem Mistura for Hyperactivity Syndrome by metabonomic method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, **36**(3):398-402.
- [5] Chen M, Su M, Zhao L, Jiang J, Liu P, Cheng J, et al. Metabonomic study of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats [J]. *J Proteome Res*, 2006, **5**(4):995-1002.
- [6] Jin YB. A combined use of acupuncture, moxibustion and Long Dan Xie Gan Tang for treatment of 36 cases of chronic pelvic inflammation [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2004, **24**(4):256-258.
- [7] Jiang RW, Wong KL, Chan YM, Xu HX, But PP, Shaw PC. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on Radix Gentianae and related adulterants by HPLC analysis [J]. *Phytochemistry*, 2005, **66**(22):2674-2680.
- [8] Yu CY, Li JB, Tian YL. Effect of Qi-Gan-Li-Shi (QGLS) Decoction on tumor necrosis factor in rabbits of cholecystitis and cholelithiasis [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2001, **7**(9):38-40.
- [9] Jin XZ, Xu M. Experimental study of extract of *Gentiana scabra* Bge. on anti-inflammation, analgesic, anti-

- anoxia and anti-fatigue effects[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2005, **16**(9):842-843.
- [10] Xu B, Zhao YM. Determination of three iridoids in decoction of *Gentiana scabra* Bge. by LC/MS/MS[J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药理学学报), 2008, **24**(2):177-180.
- [11] Wold S. Pattern recognition by means of disjoint principal component models[J]. *Pattern Recognition*, 1976, **8**:127-139.
- [12] Chen XY, Zhou YS, Fan YL, Zhang YP, Jiang XL, Zou SJ, et al. An improved rat model of cold syndrome due to Yangqi insufficiency[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 2001, **9**(3):155-159.
- [13] Liang YH, Wang J, Xie ZF. The effect of cold-property and hot-property drugs on adrenergic nerve, adrenal and metabolism function[J]. *J Beijing Med Univ*(北京医科大学学报), 1987, **19**(1):54-56.
- [14] Holmes E, Nicholson JK, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Polley S, et al. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine[J]. *Chemometri Intell Lab Sys*, 1998, **44**(1-2):245-255.
- [15] Keun HC. Metabonomic modeling of drug toxicity[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, **109**(1-2):92-106.

Changes of metabonomic profiles of rat urine after oral administration of Radix Gentianae decoction

XU Bin, ZHAO Yi-Min*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **AIM** To study the metabonomic profile of rat urine after oral intake of Radix Gentianae decoction (RGD) and to observe the correlation between the metabonomic changes and the cold-property action of Radix Gentianae. **METHODS** Ten female Wistar rats were divided into control (ig normal saline) and RGD (ig RGD 40 g·kg⁻¹·d⁻¹, for 9 d) groups. The physical parameters, such as body weight and temperature, food and water intake, were measured every 3 d from d 3 before RGD administration. At d 5, the urinary sample of each rat was collected individually and the [¹H] nuclear magnetic resonance ([¹H]NMR) spectra of the urinary samples were measured. At d 2 after the end of RGD administration, the plasma concentrations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were determined, and organ indexes were calculated after weighting the liver, kidneys, spleen, thymus, adrenals and ovaries of the rats. **RESULTS** From d 3 of RGD administration, compared with the control, the rats of RGD group showed poor physical appearance, obvious diarrhea, lower body temperature, and more stool under stimulus,

but no marked changes on diet and water intake. The plasma cAMP/cGMP ratio and organ indexes had not shown statistically significant differences between the two groups. Analysis of the [¹H]NMR data of the urinary samples showed that the RGD group and the control group were distributed in 2 clusters in the principal components analysis diagram without overlap. Escalated glucose, amino acid, 2-O glutarate, citrate and succinate levels, and reduced taurine, creatinine and dodecanoate levels were observed in urinary samples of RGD group. **CONCLUSION** Long term treatment with high dose of RGD causes a cold syndrome of the insufficiency type in the test rats. The variation of the [¹H]NMR data appeared closely associates with the cold-property of RGD, which indicates the obvious down regulation of RGD at energy metabolic progress in tricarboxylic acid cycle, fatty acid metabolism and energy conservation and utilization.

Key words: Radix Gentianae; metabonomics; magnetic resonance spectroscopy; pattern recognition

* Corresponding author.

