

**Солилцооны бүлгийн ухаанд суурилсан монгол эм мухар цагааны хүчжүүлж
шимжүүлэх үйлдлийн судалгаа**

Чан чун¹, М.Мөнхцэцэг, Э.Энхсүрэн, Чөн хун мэй, Ван шун лан

(Өвөр Монголын Үндэстний Их Сургуулийн Монгол эм эмнэлгийн дээд сургууль)

email: 15247531573@163.com

**Study on the Mechanism of Health Protection of Mongolian Medicine Polygonatum
Odoratum**

Chang Chun¹, M.Munkhtsetseg, E.Enkhsuren, Cheng Hong Mei, Wang Xiu Lan

Inner Mongolian University for Nationalities, College of Traditional Mongolian Medicine and Pharmacy

Objective: To explore the effects of Polygonatum odoratum on body based on metabonomics.

Methods: The ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) and principle component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were used to evaluate the changes of endogenous substances in rats after intragastric administration of Polygonatum odoratum.

Results: Significant differences between the control group and administration group were observed in PCA and OPLS-DA model. Five potential biomarkers between control group and administration group were identified. The relative content of Alpha-Tocotrienol, PC(14:1(9Z)/14:1(9Z)), Stearic acid, Theasapogenol A, Docosahexaenoic acid increased.

Conclusion: The biomarkers had many beneficial activities, so the Mongolian medicine Polygonatum odoratum had the function of health care.

Key words: Mongolian drug; Polygonatum odoratum; Biomarkers; UPLC-MS

Үндэслэл: Монгол эмт бодис мухар цагаан бол сарнайн язгуурын олон наст өвслөг ургамал анхилам мухар цагаан – *Polygonatum odoratum* (Mill) Druce –ын үндэслэг иш бөгөөд амтлаг, бүлээн, зөөлөн, хүнд чанартай. Мухар цагааны химийн бүрэлдэхүүнд голдуу цитрат сапонин, флаваноид, дэгдэмхий тос, полисахарид болон бичил элементүүд агуулагдана. Мухар цагаан нь дархлаа тогтолцоонд үзүүлэх үйлдэл, өтлөхийг удаашруулах, цусан дахь сахарын хэмжээг багасгах, цусан дахь өөхийг бууруулах, хавдрын эсрэг, хүчжүүлж шимжүүлэх, шар усыг арилгах, бөөрний хүйтэн хийг арилгах, ходоодны илчийг сэлбэх гэх мэт үйлдэлтэй[1]. Орчин үед солилцооны бүлгийн ухааныг өргөн хэрэглэж байгаа бөгөөд солилцооны бүлгийн ухаан бол UPLC-

MS-ыг суурь болгосон шинжилгээний салбар юм. [2-4]. Тус өгүүлэлд UPLC-MS ба химийн шинжлэлийн ухааныг ашиглаж мухар цагааны хүчжүүлж шимжүүлэх үйлдлийн уг ёсонд солилцооны бүлгийн ухаан талаас анх удаа тайлбар хийхийг зорилоо.

Судалгааны хэрэглэгдэхүүн, арга зүй

1.Судалгааны хэрэглэгдэхүүн

Судалгаанд TG16-WS центрифуг (Чанша сиан и – ын компани); HH-W600 хэлбэрийн тогтмол усаар дулаацуулах машин (Жансу мужийн Жинтан хот Рунхуа багаж техникийн компани); BCH198K цахилгаан хөдөлгүүрт машин(Чин дао хаяр компани); AUY120EXP электрон хэмжүүр(Японы До жин компани); 101A-2E инкубатор (Шанхай хотын туршилтын багаж хэрэгслийн компани); Acquity UPLC System хроматографын машин, Waters xevo G-2SQTOFмассын спектрофотометр (Америкийн Waters компани); Waters Acquity BEH-18 баганат хроматограф (50*2,1mm,1.7um) зэрэг багаж тоног төхөөрөмж болон метилийн спирт, шоргоолжны хүчил (Thermo Fisher компани); мухар цагааны талх (Өвөр монголын үндэстний их сургуулийн Хараат эмнэлгийн хороо); CMC-Na, хлоралгидрат (Тяньжин хотын Гуанфу химийн багаж хэрэгслэлийн компани) зэрэг эмийн түүхий эд, бодисуудыг ашигласан.

2.Судалгааны арга зүй

Wistar үйлдвэрийн 200-220гр жинтэй 24 харх (эр, эм тэнцүү)-г авч эрүүл харьцуулах бүлэг (C), мухар цагааны эм өгөх бүлэг (P) гэж 2 бүлэгт хуваасан. Эрүүл бүлгийн амьтдад 0.5% CMC-Na уусмал, эм өгөх бүлгийн амьтдад 0.5% CMC-Na-ийн уусмалыг мухар цагаантай найруулсан шингэнийг тус тус 2 мл/100гр хэмжээтэйгээр 42 өдөр дараалан ходоодонд нь бургуйдан өгсөн. Хамгийн сүүлчийн өдөр эм өгсөнөөс хойш 2 цагийн дараа хархны биеийн хүндийг хэмжин 10%-ын хлоралгидратыг зохих хэмжээгээр тарьж мэдээ алдуулсан ба хэвлийн гол артериас цус авч тасалгааны температурт 1 цаг тавьсны дараа центрифугт хийж 3000r/min хурдтайгаар 10 минут эргүүлсэн. Дараа нь цусны тунгалаг сийвэнг авч 80°C хөлдөөгүүрт хийн хэмжихэд бэлэн болгосон. Сорьцыг хэмжихээс өмнө 4°C-т гэсгээнэ. 100µl цусны сийвэнг 400µl ацетнитрилээр уусгаж холимогийг 30 секунд дарвилзуулж, мөн центрифугт 13000r/min хурдтайгаар 10 минут эргүүлэн дээрх тунгалаг шингэнийг авч 0.22µm-ын органик бүрхүүлээр шүүж хэрэглэхэд бэлэн болгосон.

2.1.ELISA шинжлэлийн арга

ELISA шинжлэлийн аргаар цусны сийвэн дэхь IgA, IgG, IgM зэрэг дархлааны үзүүлэлтүүдийг хэмжсэн.

2.2. UPLC-MS-ийн арга

Баганын дулаан нь 40°C, урсмал фаз (A) 0.1% метан хүчил агуулсан усан уусмал, (B) метилийн спирт, урсмал фазын шат дараалан бүрэлдсэн: 0-2 минут 8%-80% урсмал фаз B, 2-5 минут 80%-100% урсмал фаз B, 5-7минут 100% урсмал фаз B, 7-8 минут 100%-8% урсмал фаз B, 8-10минут 8% урсмал фаз B. Урсах хурд минут бүрт 4мл, сорьцийн хэмжээ 10µl. Массын жагсалын задлах нөхцөлд: ESI ионы эх болон арга билэг ионы(+; - цэнэгтэй ион) хэлбэрийг ашигласан. Туулах хэмжээ: m/z 100-1000, арга ионы хэлбэр нь(+ цэнэгтэй ион): Capillary voltage 3kV; Cone 40V, ионы эх нь 100°C, мананжуулах нь 400°C, хийн урсах хурд цаг бүрт 800L, билэг ионы хэлбэр нь(- цэнэгтэй ион): Capillary voltage 2.5kV, Cone 40V, ионы эх нь 80°C, мананжуулах нь 150°C, хийн урсах хурд цаг бүрт 600L. Массын хроматографын жагсаалтын дотоод тохируулгын шингэн болгож лейцин энцефалинийг хэрэглэнэ. Метан хүчлийн натриар массын тэнхлэгийг тохируулна. Бодисын задлалтын системийн тогтвортой чанарыг батлахын тулд тус туршилтанд массын тохируулах сорьц (QC) ашиглан хийсэн.

2.3. PCA болон OPLS-DA үр дүнгийн задлалт хийх арга

Эрүүл харьцуулах бүлэг болон Мухар цагааны бүлгийн сорьцын зөрөөг хяналтгүй ялган таних хэлбэрийн PCA аргаар задлалт хийж тоон боловсруулалт хийсэн. Цусан дахь зарим эндоген бүрэлдэхүүн биомаркерыг хяналттай ялган таних хэлбэрийн OPLS-DA-ийн тоо бүртгэлийн аргыг ашиглан тодорхойлсон болно.

Судалгааны үр дүн:

1. ELISA-ын аргаар дархлааны үзүүлэлт IgA, IgG, IgM хэмжсэн үр дүн

Хүснэгт 1. Эрүүл бүлэг болон Мухар цагааны бүлгийн амьтдын цусны сийвэн дэхь IgA, IgG, IgM-г хэмжсэн үр дүн (X+S)

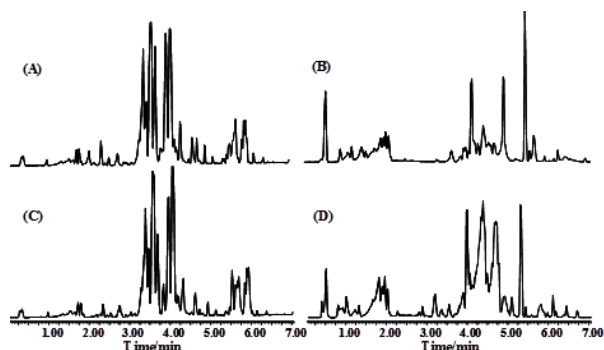
Бүлэг	IgA (µg/mL)	IgG (mg/mL)	IgM (µg/mL)
C	84.52±5.88	3.33±0.23	501.67±42.75
P	98.96±7.84*	3.77±0.33*	559.90±45.17*

Эрүүл бүлэг(C), * $p < 0.05$. Мухар цагааны бүлэг(P), * $p < 0.05$.

Хүснэгт 1- ээс үзэхэд мухар цагааны бүлгийн амьтдын цусны сийвэн дэх IgA IgG IgM-ийн үзүүлэлтүүдийг эрүүл бүлэгтэй харьцуулбал 16.2%, 13.2%, 11.6%-иар ($p < 0.05$) тус тус ихэсгэж дархлааг сайжруулж, хүчжүүлж шимжүүлэх үйлдэлтэй болохыг харуулж байна.

2. UPLC-MS-ийн шинжлэлийн үр дүн

Эрүүл бүлэг, мухар цагааны бүлгийн амьтдын цусан дахь эндоген бодисын агууламжийг UPLC-MS аргаар тодорхойлов.

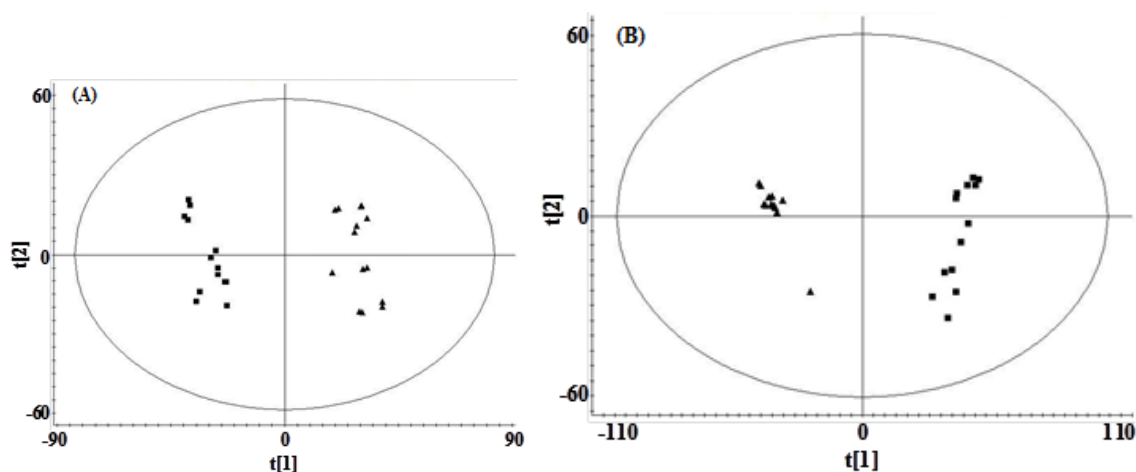


Зураг 1. Эрүүл бүлэг, мухар цагааны бүлгийн амьтдын цусан дахь эндоген бодисын суурь оргилын хроматограмм

Эрүүл бүлэг (A,B) мухар цагааны бүлэг (C,D) арга хэлбэр (A,C) билэг хэлбэр (B,D)

Зураг 1- ээс үзэхэд эрүүл бүлэг болон мухар цагааны бүлгийн оргил нь хоорондоо зөрөөтэй биш, зарим бүрэлдэхүүний харьцангуй агууламжид хувирал гарсан нь тодорхой харагдаж байна.

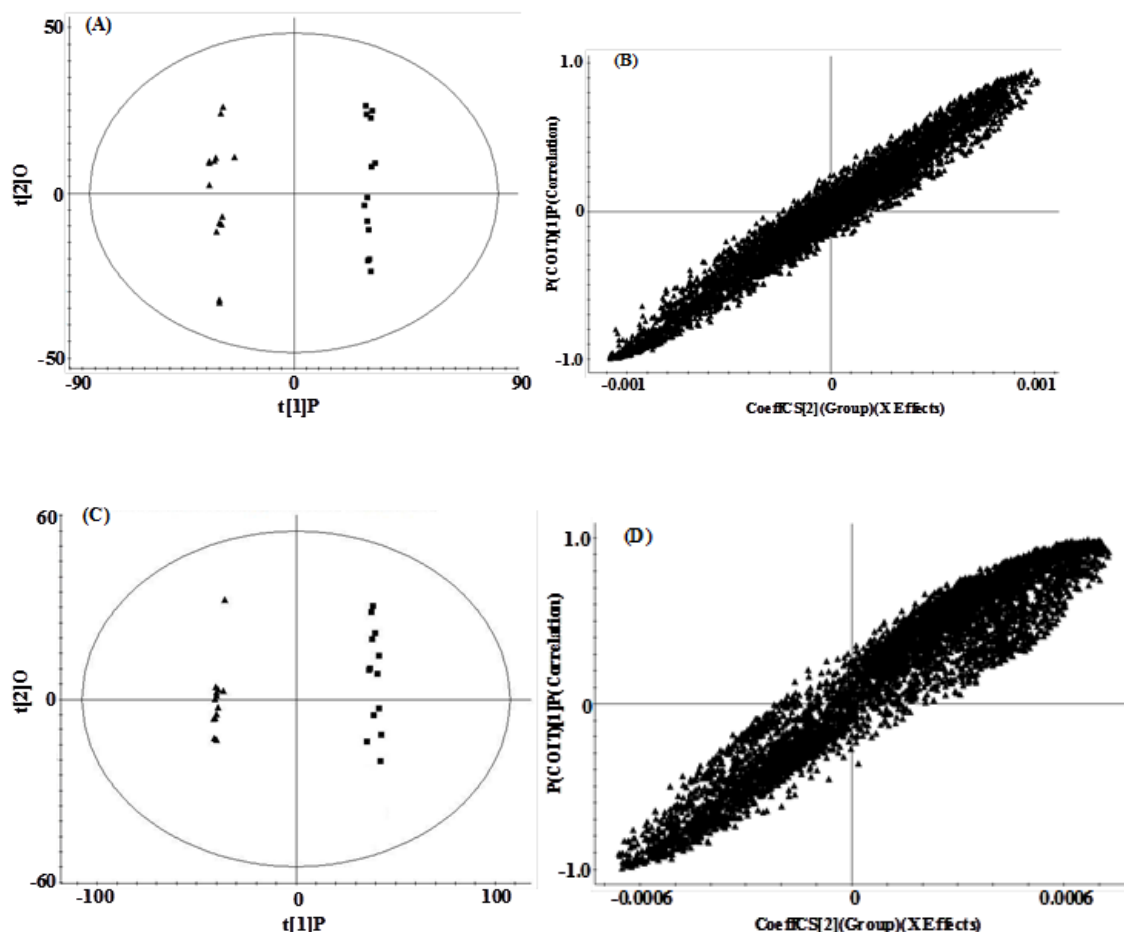
3. PCA болон OPLS-DA үр дүн



Зураг 2. Эрүүл харьцуулах бүлэг болон эм өгөх бүлэг, арга болон билэг ионы хэлбэр болох PCA хроматограмм

▲эрүүл бүлэг, ■мухар цагааны бүлэг, эрүүл бүлэг (A), мухар цагааны бүлэг (B), арга (A), билэг (B)

Зураг 2-оос үзэхэд OPLS-DA-ын задлалтаас эрүүл харьцуулах бүлэг болон эм өгөх бүлгийн сорьц нь тодорхой салсан нь харагдаж байна. Өвчин үүсгэх загварын чанарын үнэлгээ тус бүр $R^2Y=0.8992$, $Q^2Y=0.7792$. Эм өгөх бүлгийн бүрэлдэхүүний хувиралтыг цааш шинжлэхийн тулд OPLS-DA-г ашиглаж эрүүл харьцуулах бүлэг болон эм өгөх бүлэгт дүгнэлт хийж S-Plot зургыг олжээ.



Зураг 3. Эрүүл харьцуулах бүлэг, мухар цагааны бүлэг (A,B), арга, билэг (C,D) ионы хэлбэрийн нөхцөл доор олсон OPLS-DA (A,C) зураг

▲ эрүүл харьцуулах дугуйлан, ■ эм өгсөн бүлэг

Зураг 3-т үзүүлснээр цэг бүр нь 1 хувьсагчийг илэрхийлж хувьсагчийн хэмжээ нь VIP хэмжигдлийн их багаас хамаарна. Хувьсагч нь эхлэл цэгээс хэт хол бол VIP хэмжигдэл нь хэт их байна. VIP хэмжигдлийн хувьсагчийн хувиралтыг үндэслэж $VIP > 1.0$ бодисоор биомаркер болгожээ. Баримжаа бодистой харьцуулж дээд хэмжээгээр салгах массын хроматографийн тоо бүртгэл ба сурвалж бичгийн мэдээллийн материалаар биомаркертаа хяналт хийсний үр дүнд арга билэг ионы хэлбэр бүхий Alpha-Tocotrienol,

PC(14:1(9Z)/14:1(9Z)), Stearic acid, Theasapogenol A, Docosahexaenoic acid зэрэг 5 зүйлийн биомаркер тодорхойлогдсон.

Хүснэгт 3. Эрүүл бүлэг, Мухар цагааны бүлгийг харьцуулан тодорхойлсон биомаркерийн дүн

Retention time (min)	Molecular mass (Da)	Mass deviation ($\times 10^{-6}$)	Chemical formula	Compound	Multiple content change	Ion mode
4.68	423.3270	0.2	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	α - Tocotrienol	3513	-
3.93	672.4662	7.7	C ₃₆ H ₆₈ NO ₈ P	PC(14:1(9Z)/14:1(9Z))	52	-
4.81	283.2631	4.2	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Stearic acid	248	-
5.14	505.3574	7.7	C ₃₀ H ₅₀ O ₆	Theasapogenol A	162	-
3.99	327.2314	4.9	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	Docosahexaenoic acid	389	-

Мухар цагааны бүлэг vs эрүүл бүлэг

Зураг 3, хүснэгт 2-т харуулсан 5 зүйлийн биомаркер нь эрүүл бүлэгтэй харьцуулахад мухар цагааны эм өгсөн бүлэгт илэрхий нэмэгдсэн байна.

Хэлцэмж

Судалгааны явцад мухар цагааны бэлдмэл хэрэглэсэн амьтдад эндоген бодис Alpha –Tocotrienol, PC(14:1(9Z)/14:1(9Z), Stearicacid, Theasapogenol A, Docosahexaenoic acid 5-н агуулагдагцийг судлан тодорхойлсон бөгөөд эдгээр бүрэлдэхүүнүүдийг эрдэмтэд тус тусад нь тодорхойлж фармакологийн үйлдэл үйлчилгээг судалсан байна. Жан ли хө, Ма бу нарын судалгаагаар дамжин Docosahexaenoic acid бүрэлдэхүүн нь зүрх судасны өвчнөөс сэргийлэх, хөгшрөлтийн эсрэг, хавдрын эсрэг, үрэвслийн эсрэг, дархлааг сайжруулах үйлдэлтэйг судлан тогтоожээ[5]. Бидний судалгаагаар Мухар цагааны эм өгсөн бүлэгт IgA IgG IgM-ийн хэмжээг эрүүл бүлэгтэй харьцуулбал 16.2%, 13.2%, 11.6%-иар ихэсгэсэн нь мухар цагаан нь Docosahexaenoic acid-ийн нэгдлийг ихэсгэснээр дархлаа сайжруулах үйлдэл үзүүлсэн байж болох юм. Мөн Жан ли хө-гийн судалгаанд Docosahexaenoic acid нь хөгшрөлтийн эсрэг үйлдэл үзүүлсэн бөгөөд энэ нь мухар цагааны хүчжүүлж шимжүүлэх үйлдэл Docosahexaenoic acid-ийн үйлдэл байж болохыг харуулж байна.

Жан лан нарын судалгаагаар том хулганад урт хугацаагаар PC(14:1(9Z)/14:1(9Z)–г өгснөөр цээжлэх чадварыг сайжруулж байсан. Alpha –Tocotrienol нь тосонд уусдаг витамин бөгөөд антиоксидант, мэдрэлийг хамгаалах, хавдрыг эсэргүүцэх зэрэг олон талын үйлдэлтэй байна[7]. Theasapogenol A бол элгийг хамгаалах, цусан дахь өөх тосыг багасгах, хромосомын гэмтлээс сэргийлэх, үрэвслийг дарж, шээс хөөх үйлдэлтэй[8]. Хуан шиао фун нарын судалснаар Stearic acid нь том хулганы элэгний хавдрын үед элэгний эсийн хэлбэр эргэн нөхөн төлжихөд нөлөөлнө[9] гэж үзжээ. Дээрхи эрдэмтдийн хийсэн судалгаанаас харахад бидний судлан тогтоосон биомаркерууд нь олон талын фармакологийн үйлдэл үзүүлж болохыг харуулсан байна.

Дүгнэлт:

1. Мухар цагааны бэлдмэл нь туршилтын амьтдын цусны сийвэн дэх IgA IgG IgM-ийн хэмжээг эрүүл бүлэгтэй харьцуулбал 16.2%, 13.2%, 11.6%-иар ($p < 0.05$) тус тус ихэсгэсэн ба дархлааг сайжруулж, хүчжүүлж шимжүүлэх үйлдэлтэй байна.
2. Туршилтын амьтанд мухар цагааны бэлдмэл нь биеийн дотоод дахь эндоген бодис Alpha –Tocotrienol, PC(14:1(9Z)/14:1(9Z)), Stearic acid, Theasapogenol A, Docosahexaenoic acid 5-н агуулагдацыг нэмэгдүүлж байна.
3. Мухар цагаан нь туршилтын амьтдад Docosahexaenoic acid –ийн хэмжээг нэмэгдүүлснээрээ дархлаа сайжруулж, хүчжүүлэн шимжүүлэх үйлдэл үзүүлсэн байж болно.
4. Цаашид мухар цагааны био идэвхит нэгдлийн судалгаа болон дээрхи 5 биомаркерын фармакологийн судалгааг лавшруулан хийх ба мухар цагааны өтлөхийг удаашруулах, дархлаа сайжруулах зэрэг үйлдлийг гүнзгийрүүлэн судлах шаардлагатай.

Номзүй:

1. Лувсан, “Монгол эмийн судлал”, (М) Хөх хот Өвөр монголын ардын хэвлэлийн хороо, 2006, 358-359
2. 唐乾利, 黄欣, 俞渊, 等. 兔胆石症的代谢组学特征及大黄灵仙胶囊的干预作用[J]. 医药导报, 2013,32(12):1538-1542.
3. 王刚, 杜士明, 常明泉, 等. 代谢组学在中药研究和抗肿瘤研究中的应用进展[J]. 医药导报, 2010,29(3):339-342.
4. 张瑞兴, 刘舒, 皮子凤, 等. 汞离子对细胞代谢通路影响的代谢组学[J]. 高等学校化学学报, 2014,35 (6) : 1146-1151.
5. 蒋利和, 马博, 谢正轶, 等. 二十二碳六烯酸对老年大鼠脑组织抗氧化和脂肪酸的影响[J]. 食品科学, 2011,32 (13) : 284-288.
6. 董坚, 袁高峰, 方旭波, 等. n-3 多不饱和脂肪酸对小鼠非酒精性脂肪肝的预防作用[J]. 营养学报, 2014,36 (5) : 445-449.
7. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant[J]. Mol. Vis., 2009, 5:855-860.
8. 王兵, 蒋朝晖. 齐敦果酸的研究[J]. 中国中药杂志, 1992,27 (7) : 393-397.
9. 黄晓峰, 苏慧慈, 补永安. 硬脂酸和苹果酸对培养大鼠肝癌细胞形态的影响[J]. 第四军医大学学报, 1996,17 (5) : 321-325.

Танилцаж нийтлэх санал өгсөн:

Академич Ш.Болд