【药动学评价】

慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠脑组织^{1}H-NMR代谢组学研究

刘晓节[1, 2, 3]，郑兴宇[1, 2, 3]，李震宇[1, 2, 3]，高晓霞[1, 2, 3]，秦雪梅[1, 2, 3*]

1. 山西大学中医药现代研究中心，山西 太原 030006
2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室，山西 太原 030006
3. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室，山西 太原 030006

摘 要：目的 采用高分辨核磁共振^{1}H谱（^{1}H-NMR）代谢组学技术研究慢性温和不可预知应激（CUMS）抑郁大鼠脑组织中代谢物及代谢通路的变化，探讨抑郁症的发病机制。**方法** 12只雄性SD大鼠随机分为模型组和对照组，采用CUMS对模型组大鼠进行为期4周的造模，进行称体质量、旷场实验和糖水偏爱实验验证模型是否成功，造模结束后收集大鼠脑组织。采用两相提取法（甲醇/氯仿/水）对脑组织进行提取，得到水溶性和脂溶性代谢物。应用^{1}H-NMR技术结合多元统计和代谢通路分析筛选出与抑郁相关的脑内差异代谢物，并构建其代谢通路。**结果** 行为学数据显示，与对照组比较，模型组大鼠的体质量、糖水偏爱率、旷场的穿格数和直立次数均显著降低（P＜0.05），显示了抑郁状态。在大鼠脑组织的^{1}H-NMR图谱中共指认出35种内源性代谢产物。脑组织中水溶性和脂溶性代谢物主成分分析（PCA）均显示模型组与对照组分开，与行为学结果一致，表明造模成功；OPLS-DA分析找到9个水溶性差异代谢物和6个脂溶性差异代谢物。就水溶性代谢物而言，与对照组比较，模型组中肌酐、谷氨酰胺、牛磺酸和γ-氨基丁酸含量显著增加（P＜0.05、0.01、0.001），丙二醇、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸和赖氨酸含量显著降低（P＜0.05、0.01、0.001）。就脂溶性代谢物而言，与对照组比较，模型组-(CH_2)n和-$N(Me_3)_3$含量显著升高（P＜0.05、0.001），胆固醇的C18/19甲基、R-CH_3、CH_2OPO_2-、-CH=CH-含量显著降低（P＜0.05、0.01、0.001）。与对照组比较，CUMS造模后5条代谢通路发生显著变化：缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成，牛磺酸和亚硫磺酸代谢，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，糖降解和糖异生通路和丙酮酸代谢。**结论** 运用^{1}H-NMR代谢组学技术结合多元统计分析和代谢通路分析，阐明抑郁症的发病机制与能量代谢、氨基酸代谢和神经递质合成等相关。

关键词：高分辨核磁共振^{1}H谱（^{1}H-NMR）；代谢组学；慢性温和不可预知应激；脑内源性代谢物；差异代谢物；代谢通路

中图分类号：R962.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1674-6376（2019）04-0612-10

DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.003

^{1}H-NMR metabonomic study on brain tissues of chronic unpredicted mild stress model of depression in rats

LIU Xiaojie[1,2,3], ZHENG Xingyu[1,2,3], LI Zhenyu[1,2,3], GAO Xiaoxia[1,2,3], QIN Xuemei[1,2,3]

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China
2. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China
3. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To study the metabolic changes of brain tissues of chronic unpredictable mild stress (CUMS) rats by 1H-NMR and obtain the potential biomarkers of CUMS rats to investigate the pathogenesis of depression. **Methods** A total of 12 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups,namely the control and model groups. The CUMS procedure was conducted for four weeks. The weight test, open field experiment and sugar preference experiment were conducted to verify the

收稿日期：2018-09-15

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81803962）；国家“重大新药创制”科技重大专项课题（2017ZX09301047）

第一作者：刘晓节（1987—），女，博士，讲师，研究方向为中药药理研究。Tel：（0351）7018379 E-mail：liuxiaojie@sxu.edu.cn

***通信作者：**秦雪梅，博士，教授，研究方向为中药代谢组学与新药研发。Tel：（0351）7018379 E-mail：qinxm@sxu.edu.cn

success of the model. The brain tissues of rats were collected at the end of the procedure. The endogenous metabolites in brain tissues were extracted by MeOH/$CHCl_3$/H_2O. And the hydrosoluble and liposoluble metabolites were analyzed by ^{1}H-NMR with different sequences. The differences of metabolites between control group and CUMS group were analyzed by multivariate statistical analysis. The metabolic pathways were constructed. **Results** Body weight, sucrose preference, ambulation number and rearing number in open-field test of the CUMS rats decreased significantly after 28d procedure as compared with those of the control groups ($P < 0.05$). Also, in the scores plot of principle component analysis (PCA) on brain metabolites, the CUMS-depressed rats were significantly separated with the control rats, suggesting the CUMS model has been built successfully. Thirty-five metabolites were identified in the ^{1}H-NMR spectra of brain tissues. Nine hydrosoluble differential metabolites and six fat-soluble differential metabolites were found by OPLS-DA analysis. Taking hydrosoluble metabolites into account, the content of creatinine, glutamine, taurine and gamma-aminobutyric acid in the CUMS rats significantly increased ($P < 0.05$), while propanediol, glutamic acid, leucine, valine and lysine were significantly decreased in CUMS model group as compared with the control group ($P < 0.05$, 0.01, and 0.001). As far as fat-soluble metabolites are concerned, compared with the control group, the content of -(CH_2)n and -$N(Me_3)_3$ in the model group increased significantly ($P < 0.05$, 0.001), while the content of C18/19 methyl, R-CH_3, CH_2OPO_2-, and -CH=CH- in cholesterol decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Compared with the control group, there were significant changes in five metabolic pathways: valine, leucine and isoleucine biosynthesis, taurine and sulfite metabolism, alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism, sugar degradation and gluconeogenesis pathway and pyruvate metabolism. **Conclusion** Using ^{1}H-NMR metabonomics combined with multivariate statistical analysis and metabolic pathway analysis, the pathogenesis of depression is related to energy metabolism, amino acid metabolism and neurotransmitter synthesis.

Key words: ^{1}H-NMR; metabonomics; chronic unpredicted mild stress; endogenous metabolites of brains; differential metabolites; metabolic pathways

抑郁症是一类以情绪低落为主的精神疾病，以显著而持久的情绪低落、兴趣缺失、认知和睡眠障碍等为主要临床特征，具有高患病、高致残、高复发等特点[1]。近年来，抑郁症的发病率正急剧攀升，已成为一个严重的全球问题，受到国内外的广泛关注[2-4]。

抑郁症发病机制复杂，涉及多系统、多环节的功能失调，可表现为多种生化物质的动态平衡异常，如乙酰胆碱能增强、神经内分泌功能异常、细胞因子的免疫炎症反应等[2]，但抑郁症的病因至今尚不完全清楚。因此，采用先进的技术，从整体上研究抑郁症，从系统生物学的角度阐明抑郁症的发病机制成为当前研究的热点[3-6]。目前对于抑郁症的临床诊断尚处于症状推断阶段，多采用汉密尔顿抑郁量表（hamilton depression scale，HAMD）和抑郁自评分表（self-rating depressionscale，SDS）作为主要的诊断依据，缺乏客观、可量化的实验指标[3]。生物标志物的发现及其与抑郁症发病机制的相关性受到越来越多的关注，抑郁症生物标志物的发现可以为抑郁症的诊断以及药物治疗效果的评价提供更加准确、客观的指标，有利于进一步认识抑郁症的发病机制[7-8]，而基于各种分析方法的代谢组学技术是发现诊断生物标志物的有效手段之一。

代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系的代谢途径的一种技术[9-11]。代谢产物是生物代谢的终点，被认为是“组学”研究的最终方向[9]。从分析代谢物的角度出发，代谢组学有针对性地研究疾病的发生、发展及疾病引发病理过程的代谢产物中的共性和特异性指标，以寻找到与疾病有关的生物标志物，在疾病发病机制、疾病的早期诊断和预防、药物干预和评价等研究领域显示了巨大的潜能[12]。高分辨核磁共振^{1}H谱（^{1}H-NMR）技术能在一张谱图中同时定量地检测几百种化合物，与其他检测技术比较，NMR具有生物样品预处理简单、在接近生理状态的缓冲液中采集数据、检测无偏向性、重复性好等优点。

本课题组前期成功复制了慢性温和不可预知应激抑郁（CUMS）大鼠模型[13]，并应用NMR技术对大鼠尿液、血液、粪便样本进行了系统研究[14-16]，建立了这些样本的代谢组学研究方法，发现了尿液、血浆中与抑郁症有关的差异代谢物。

在代谢组学的研究中，尿液和血液反映了机体整体系统中代谢物的变化，而脑组织是应激因素的直接靶器官，更能直接、完全的反映由多种应激因素引起的抑郁特征及相关代谢物的变化[17]。因此，全面表征脑组织中的内源性代谢物对了解抑郁症发病中的脑组织所起作用和变化具有重要的意义。然而，目前国内外学者对抑郁证的研究更多集中在大脑或脑脊液中神经递质、神经营养因子、信号通

路等方面[18-20]，关于脑组织内源性代谢物的研究鲜见报道。本实验首先采用两相提取法对大鼠脑组织中的水溶性和脂溶性代谢物进行提取，然后应用NMR代谢组学技术对CUMS抑郁大鼠这两类代谢物进行分析，旨在发现脑组织中与抑郁症相关的差异代谢物和代谢通路，为从新的角度探讨抑郁症发病机制提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

成年雄性SD健康大鼠12只，清洁级，体质量180～200 g，购自中国军事医学科学院动物实验中心，实验动物生产许可证SCXK（京）2017-0012，动物自然昼夜节律光照，自由进食进水饲养1周适应环境。

1.2 主要试剂

蔗糖，购自北京美味先食品有限公司；乙腈、高氯酸、甲醇、氯仿，均为天津试剂厂的分析纯试剂；水为娃哈哈纯净水；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠，均购自天津市光复科技发展有限公司；NMR试剂重水（D_2O）、氘代氯仿和氘代甲醇，均购于美国默克试剂公司；3-（三甲基硅基）氘代丙酸钠（TSP）和四甲基硅烷（tetramethylsilane，TMS），均购自美国Cambridge Isotope Laboratories Inc.公司。

1.3 主要仪器

代谢笼（苏州实验动物笼具厂）；YSD-4药理生理实验多用仪（蚌埠医学院无线电二厂）；LD500－1电子天平（沈阳龙腾电子有限公司）；101系列恒温干燥箱（北京和同创业科技有限责任公司）；超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司）；Fluko超细匀浆机（上海弗卢克流体机械制造有限公司）；敞箱：自制由不透明材料制成，立柱体，高为40 cm，长宽各为80 cm，周壁底面为黑色，底面由面积相等的25块（16×16 cm^2/块）组成，由白线划分；Bruker NMR超导NMR谱仪购自Bruker公司（山西省分析测试中心）。

2 方法

2.1 动物分组及实验环境

通过体质量和旷场试验的行为学得分将大鼠分为对照组和模型组，每组6只。动物均饲养于普通级动物房，室内温度保持为（22±2）℃，相对湿度保持为30%～40%，各组大鼠均给予常规饲料。

2.2 CUMS造模程序及动物行为学观察指标

CUMS模型的建立包括10种不同的刺激：笼子倾斜（24 h）、潮湿垫料（24 h）、噪声刺激、冰水游泳（5 min）、禁食（24 h）、禁水（24 h）、暴露在50 ℃的温度下（5 min）、夹尾（1 min）、电击足底（电压为50 mV，每隔30 s刺激1次，每次持续10 s，共15次）、陌生物体，每日给予1种刺激，每种刺激累计使用2～3次，顺序随机，使动物不能预料刺激的发生，应激持续28 d。对照组不给予任何刺激。

在实验前1天（－1 d）以及造模第28天，按文献方法[13-15]，进行称体质量、旷场实验和糖水偏爱实验，旷场实验观察的指标包括中央格停留时间、水平爬行格数、垂直次数。

2.3 大鼠脑组织NMR分析

2.3.1 样品的采集与处理 实验第28天，在冰上取脑组织，冰生理盐水洗净，置于液氮中冷冻后，存于－80 ℃冰柜。

实验前期对3种不同的提取方法（高氯酸单相提取法、乙腈单相提取法、甲醇/氯仿/水两相提取法）进行了考察，根据提取信息量，选择甲醇/氯仿/水的两相提取法对脑组织中代谢物进行全面提取。称取完整组织，转移到一个玻璃小瓶里，加入4 mL/g的甲醇和0.85 mL/g的水，匀浆、涡旋；添加2 mL/g的氯仿，涡旋；然后加入2 mL/g氯仿和2 mL/g的水，涡旋；将上述混合溶液置于冰上15 min后，4 ℃、13 000 r/min离心15 min。离心后的溶液分为2层，上层为甲醇/水溶剂层（极性代谢物）；下层为氯仿层（脂类代谢物）。依次把上层和下层样品转移至玻璃小瓶中，使用高速真空浓缩器和氮气流去除溶剂。在NMR分析前，把极性组织提取物溶于580 μL NMR缓冲液（100 mmol/L PBS/D_2O，pH值为7.4，包含0.1 mmol/L TSP），TSP为位移内标；同时脂类提取物储存于580 μL混合氘代核磁试剂中（氘代氯仿∶氘代甲醇＝2∶1，氘代氯仿中含0.03% TMS）。上述混合溶液以12 000×g离心5 min；取550 μL上清液置于核磁管里进行NMR实验。

2.3.2 脑组织NMR实验参数 ^{1}H的共振频率为600.13 MHz。

普通脉冲序列：采用简单的90°脉冲，预饱和方式抑制水峰，实验温度为298.0 K，谱宽12 000 Hz，弛豫时间为2 s，数据点为32 K，谱宽为2×10^{-5}，扫描次数64次，获得时间为1.36 s。在进行傅立叶变换之前，采集的火焰离子化检测仪（FID）信号充零至64 K，加窗函数LB为0.3。使用Topspin 2.1软件对所有的^{1}H-NMR谱图进行细致的相位校正和基线调整，并以乳酸的甲基峰的化学位移定标（CH_3，δ 1.33）。

Carr-Purcell-Meiboom-Gill（CPMG）脉冲序列：自旋弛豫延迟为320 ms，自由感应衰减为32 K数据点，谱宽为2×10^{-5}，扫描次数64次，获得时间为1.36 s，自旋回波延迟时间为400 ms。其余参数同普通脉冲序列。

2.3.3 脑组织NMR数据处理 采用MestReNova（Mestrelab Research，Santiago de Compostella，西班牙）核磁图谱专业处理软件对所有NMR图谱进行傅立叶转换并进行相位、基线调整。在CPMG图谱中，以TSP或TSM的化学位移（δ 0.0）为标准对谱图进行化学位移的校正，然后以δ 0.04 ppm为单位，对δ 0.4～4.4区域的谱图进行等宽度分割；对于90°脉冲序列得到的NMR图谱，以－N$(Me_3)_3$的化学位移（δ 3.24）为标准对谱图进行化学位移的校正，以δ 0.04为单位，对δ 0.5～5.5区域的谱图进行等宽度分割；然后对所得图谱进行分段积分。采用面归一化法，将数据归一化处理。

2.3.4 数据分析 运用SIMCA-P软件包（Umetrics，Umeå，Sweden）将积分数据进行中心化和规格化后，进行多元统计分析。主成分分析（Principal component analysis，PCA）反映的是样本内部固有的差异性和相似性，以显示数据的原始分类状态。为强化组间差异，进一步采用正交偏最小二乘法判别分析（Orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）。采用帕累托标度化（Pareto scaling）对数据进行标准化（中心化+标度化），模型的质量由R^2和Q^2值描述，R^2被定义为由模型解释的数据中的方差的比例，并且指示拟合优度；Q^2被定义为模型可预测的数据中的方差比例，表示可预测性。OPLS-DA模型的有效性通过CV-ANOVA方法进行验证。

依据S-plot中离原点越远的点VIP（variable importance in the projection）值越大，变量的VIP值越大，对分组贡献越大的原则，得到VIP＞1的代谢物。对VIP＞1的代谢产物，用SPSS 11.5软件，采用*t*-test检验筛选差异代谢物。

将差异代谢物导入MetaboAnalyst 3.0（http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst）中进行差异通路分析，分析结果中每条通路的影响值（impact value，IV）用来评价和差异代谢物的相关性，IV＞0.1的通路被认为是与CUMS引起的抑郁相关性较高的通路。

3 结果

3.1 行为学结果

模型建立之前，模型组和对照组的体质量、糖水偏爱率、旷场实验得分（水平格数、垂直次数和不动时间）均没有显著性差异。在造模第28天，与对照组比较，模型组大鼠体质量显著下降（$P<0.05$），糖水偏爱率也显著降低（$P<0.05$），行为学指标包括水平格穿越数和垂直次数显著减少（$P<0.05$），静止时间明显延长。CUMS抑郁模型大鼠活动能力显著下降、兴趣丧失、快感缺乏，符合抑郁症临床表现，说明造模成功。结果见表1。

表1 对照和模型组体质量、糖水偏爱和旷场实验得分结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 1 Body weights，sucrose preference and scores in open-field tests of control and depressed rats（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	体质量/g		糖水偏爱/%		旷场实验					
					水平格数		垂直次数		不动时间	
	－1 d	28 d	－1 d	28 d	－1 d	28 d	－1 d	28 d	－1 d	28 d
对照	239.81±9.92	316.06±29.94	79.69±32.21	79.64±8.91	71.50±37.96	55.83±23.78	11.66±6.83	8.17±7.08	18.6±44.42	14.0±28.22
模型	235.56±18.16	268.44±15.9*	73.73±11.83	55.03±9.56*	90.13±17.43	22.37±13.9*	13.3±4.52	1.87±1.55*	0.14±0.39	50.52±56.62

与对照组比较：*$P<0.05$

*$P<0.05$ *vs* control group

3.2 脑组织NMR图谱的指认

图1为对照组大鼠脑组织水溶性代谢物和脂溶性代谢物^{1}H-NMR典型谱图。参照文献[20-21]和HMDB数据库（http://www.hmdb.ca/），根据化合物化学位移、峰裂分情况和耦合常数对图谱进行物质指认，鉴定了35个化合物，指认结果见表2。

3.3 CUMS大鼠脑组织差异代谢物的鉴定

3.3.1 脑组织水溶性差异代谢物 对对照组和CUMS模型组的脑组织样本进行PCA分析（PC1：43.2%；PC2：14.7%），得到散点图（图2）：PC1可以将模型和对照组分开，与行为学结果一致，表明CUMS动物模型复制成功。

OPLS-DA模型验证了PCA的分析结果，表示模型质量的所有参数见表3。$R^2X>0.50$、$R^2Y=1.0$和$Q^2>0.80$表明所建模型有效，可用于后续差异代谢物的鉴定。从OPLS-DA载荷图中找到引起两组分离的差异代谢物共9个（图2-C、表4）。如表4所示，与对照组比较，模型组有5个水溶性内源性代谢

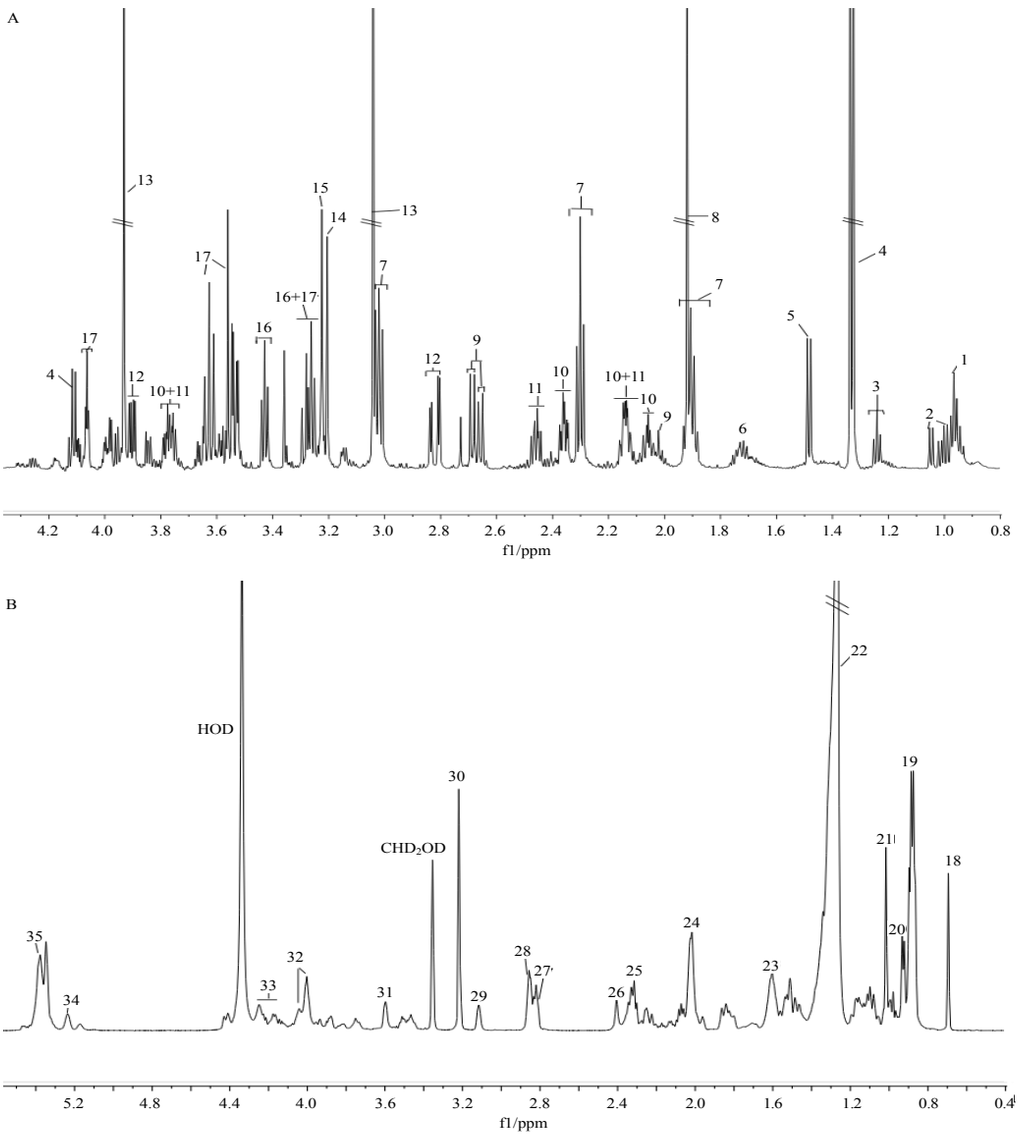


图1 对照组大鼠脑组织提取物的水溶性成分CPMG典型图谱（A）和脂溶性溶性成分90°脉冲图谱（B）

Fig. 1 CPMG spectrum of hydrosoluble metabolites（A） and diffusion-edited NMR spectrum of liposoluble metabolites（B） of brain tissues of rats in control group

表2 大鼠脑组织中35种代谢物归属

Table 2 ^{1}H-NMR assignments of major metabolites from brain tissues of rats

编号	名称	编号	名称	编号	名称
1	亮氨酸/异亮氨酸	13	肌酸/磷酸肌酸	25	Fβ：R-CH_2CH_2CO
2	缬氨酸	14	胆碱	26	CH=$CHCH_2$CH=CH
3	丙二醇	15	磷酸胆碱/葡糖蛋白	27	Fα：R-CH_2CH_2CO
4	乳酸	16	牛磺酸	28	-CH=$CHCH_2CH_2CH_2CO$
5	丙氨酸	17	肝糖	29	-CH-CH-CH_2-CH=CH
6	亮氨酸/赖氨酸	18	胆固醇的C18/19甲基	30	-CH-CH-（CH_2-CH-CH）y
7	γ-氨基丁酸	19	R-CH_3	31	-$CH_2NH_3^+$
8	醋酸	20	胆汁酸C21甲基	32	-N（Me_3）$_3$
9	*N*-乙酰天冬氨酸	21	Chol-19	33	（CH_3）$_3N^+CH_2$
10	谷氨酸	22	-（CH_2）$_n$-	34	CH_2OPO_2 -
11	谷氨酰胺	23	Fγ：R-CH_2CH_2CO	35	-CH=CH-
12	天冬氨酸	24	CH=$CHCH_2$CH=CH		

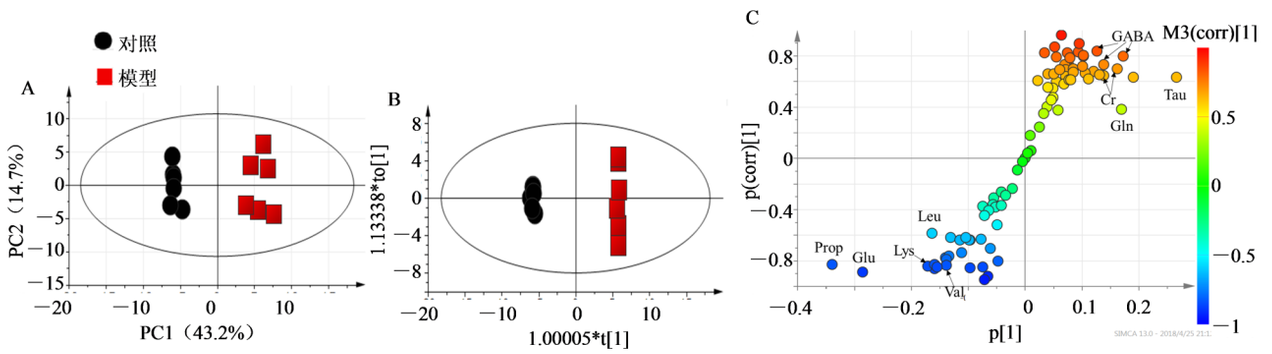


图2 CUMS造模28 d后大鼠脑组织水溶性代谢物 ^{1}H-NMR谱的PCA散点图（A）、OPLS-DA散点图（B）与S-plot载荷图（C）

Fig. 2 PCA score plot (A), OPLS score plot (B) and corresponding S-plot (C) derived from ^{1}H-NMR spectra of hydrosoluble metabolites from brain tissues of rats 28 d after CUMS modeling

表3 验证模型有效性参数列表

Table 3 Parameters indicating model quality of OPLS-DA models

	OPLS-DA模型			
	N	R^2X/cum	R^2Y/cum	Q^2
对照组*vs*模型组水溶性代谢物	1P+1O	0.566	1	0.869
对照组*vs*模型组脂溶性代谢物	1P+2O	0.751	1	0.994

物峰面积明显降低（$P<0.05$、0.01、0.001），分别为：丙二醇、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸和赖氨酸；有4个内源性代谢物峰面积明显升高（$P<0.05$、0.01、0.001），分别为：肌酐、谷氨酰胺、牛磺酸和γ-氨基丁酸（GABA）。

3.3.2 脑组织脂溶性差异代谢物 对对照组和模型组脑组织中的脂溶性成分进行PCA分析（PC1：61.1%；PC2：18.6%），散点图（图3-A）显示两组能明显分开，表示造模成功；从OPLS-DA的载荷图（图3-C）中找到对两组分离贡献较大的代谢物。脂溶性成分的OPLS-DA模型的有效性采用CV-ANOVA进行评估，模型质量的所有参数见表3。R^2X>0.50、R^2Y=1.0和Q^2>0.80表明所建模型有效，可用于后续差异代谢物的鉴定。引起对照组和模型组脑组织差异的6个代谢物中，与对照组比较，模型组-(CH_2)n和-N$(Me_3)_3$峰面积明显升高（$P<0.05$、0.001），胆固醇的C18/19甲基、R-CH_3、CH_2OPO_2-、-CH=CH-峰面积明显降低（$P<0.05$、0.01、0.001）。结果见表5。

3.4 代谢通路分析

使用MetPA对差异代谢物进行通路分析。与对照组比较，CUMS造模后，5条代谢通路发生显著变化（VIP>0.1）：缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸合成，牛磺酸和亚硫磺酸代谢通路，丙氨酸、天冬氨酸和

表4 脑组织水溶性差异代谢物模型组和对照组的峰面积和变化趋势（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 4 Peak areas and change trends of hydrosoluble metabolites in rats brain tissues between control and model groups（$\bar{x}\pm s$, $n=6$）

化合物	化学位移	对照组峰面积	模型组峰面积	变化趋势
谷氨酸	2.12	$0.01\pm3.64\times10^{-4}$	$9.09\times10^{-3}\pm1.66\times10^{-3*}$	下降
亮氨酸	1.72	$0.01\pm2.49\times10^{-4}$	$9.52\times10^{-3}\pm3.65\times10^{-4***}$	下降
赖氨酸	1.68	$5.17\times10^{-3}\pm1.74\times10^{-4}$	$3.29\times10^{-3}\pm3.89\times10^{-4**}$	下降
丙二醇	1.25	$0.20\pm2.7\times10^{-3}$	$6.32\times10^{-3}\pm1.14\times10^{-3*}$	下降
缬氨酸	0.96	$0.03\pm4.56\times10^{-4}$	$0.02\pm1.19\times10^{-3***}$	下降
牛磺酸	3.44，3.28	$0.04\pm3.07\times10^{-4}$	$0.05\pm2.16\times10^{-3***}$	升高
肌酐	3.04，3.92	$0.10\pm1.15\times10^{-3}$	$0.12\pm1.79\times10^{-3**}$	升高
谷氨酰胺	2.32	$0.024\pm3.83\times10^{-4}$	$0.027\pm1.72\times10^{-3*}$	升高
GABA	1.88，2.28，3	$0.06\pm1.35\times10^{-3}$	$0.08\pm2.14\times10^{-3***}$	升高

与对照组比较：$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group

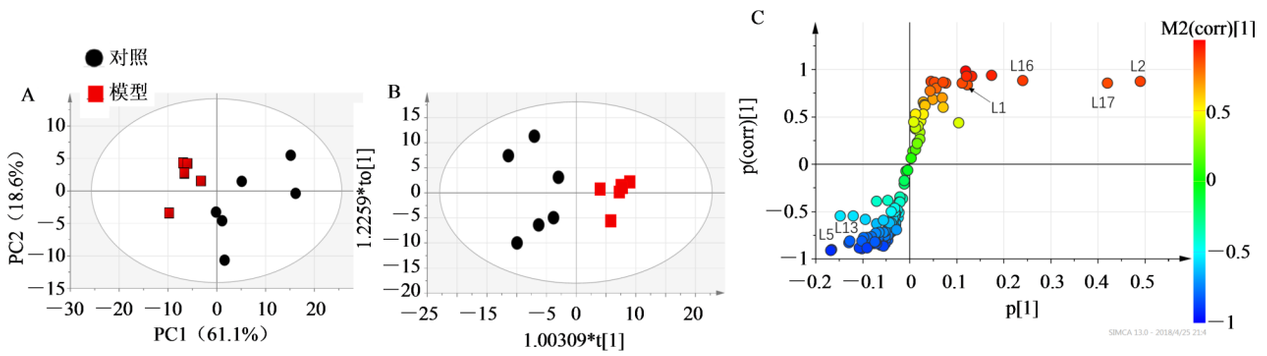


图 3　CUMS 造模后 28 d 大鼠脑组织脂溶性代谢物 ^{1}H-NMR 谱的 PCA 散点图（A），OPLS-DA 散点图（B）与 S-plot 载荷图（C）

Fig. 3　PCA score plot（A），OPLS score plot（B）and corresponding S-plot（C）derived from ^{1}H-NMR spectra of liposoluble metabolites from brain tissues of rats 28 d after CUMS modeling

表 5　脑组织水溶性差异代谢物模型组和对照组的峰面积和变化趋势（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

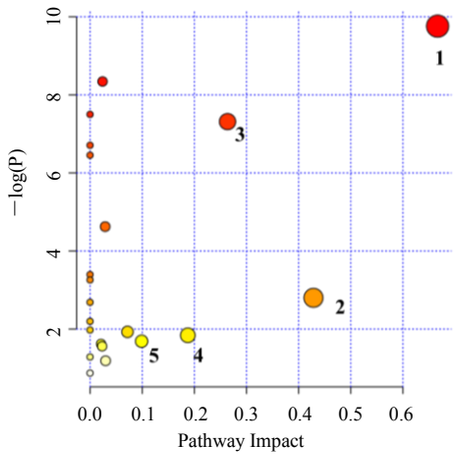
Table 5　Peak areas and change trends of liposoluble metabolites in rats brain tissues between the control group and model group（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

化合物	位移	对照组峰面积	模型组峰面积	变化趋势
胆固醇的 C18/19 甲基	0.68	$1.73\times10^{-4}\pm6.05\times10^{-6}$	$4.76\times10^{-4}\pm6.69\times10^{-6***}$	升高
R-CH_3	0.88	$4.78\times10^{-3}\pm5.11\times10^{-4}$	$6.20\times10^{-3}\pm2.43\times10^{-4*}$	升高
-(CH_2)n	1.36	$3.54\times10^{-3}\pm5.50\times10^{-4}$	$1.81\times10^{-3}\pm4.90\times10^{-4*}$	下降
-N(Me_3)$_3$	3.24	$2.33\times10^{-3}\pm7.00\times10^{-5}$	$1.99\times10^{-3}\pm1.76\times10^{-4***}$	下降
CH_2OPO_2-	4.24	$0.03\pm9.36\times10^{-5}$	$0.04\pm2.09\times10^{-3***}$	升高
-CH=CH-	5.36	$7.35\times10^{-5}\pm1.98\times10^{-5}$	$6.69\times10^{-4}\pm1.82\times10^{-4**}$	升高

与对照组比较：$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group

谷氨酸代谢，糖降解和糖异生通路和丙酮酸代谢（图 4）。这些代谢通路主要涉及能量代谢、神经递质的合成等。



1-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成；2-牛磺酸和亚硫磺酸代谢通路；3-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢；4-糖降解和糖异生通路；5-丙酮酸代谢

1-Valine，leucine and isoleucine biosynthesis；2-Taurine and hypotaurine pathways；3- Alanine，aspartate and glutamate metabolism；4-Glycolysis and gluconeogenesis pathways；5-Pyruvate metabolism

图 4　使用 MetPA 数据库构建的相关代谢通路图

Fig. 4　MetPA analysis of related metabolic pathways

4　讨论

在正常状态下，生物机体中各代谢物及其代谢途径通过相互制约处于平衡状态。当机体发生病变或受到外界刺激时，这种平衡就会被打破，表现为体内代谢物水平的变化及相关代谢路径的紊乱。本研究采用 NMR 技术对 CUMS 抑郁大鼠脑组织进行代谢组学分析，通过 OPLS-DA 分析共发现了 15 种 CUMS 引起的差异代谢物，包括 9 个水溶性差异代谢物和 6 个脂溶性差异代谢物。鉴于脂溶性代谢物均为化合物的片段，在此主要讨论 9 个水溶性差异代谢物及其代谢通路。这些物质在抑郁大鼠脑组织出现了异常的含量升高或降低的改变，进而引起了这些物质所涉及的生物代谢通路的紊乱，这既是抑郁病症在脑组织的病理作用体现，同时也反映了抑郁症发生的机制。这些代谢物主要参与机体的能量代谢（糖降解和糖异生通路和丙酮酸代谢）、神经递质合成（缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成，牛磺酸和亚硫磺酸代谢和丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢）。

4.1 能量代谢

与对照组比较，CUMS大鼠脑组织中糖降解和糖异生通路和丙酮酸代谢异常，表明抑郁大鼠能量代谢的紊乱。同时，另一氨基酸——缬氨酸是人体必需氨基酸，和苏氨酸一起间接参与三羧酸循环，其含量的减少可能与CUMS导致机体能量代谢过度消耗有关[21]。

4.2 神经递质的合成

4.2.1 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 亮氨酸和缬氨酸属于支链氨基酸（BCAAs），可通过血脑屏障，并且在通过血脑屏障时与5-羟色胺（5-HT）的前体色氨酸存在竞争[22]。与对照组比较，BCAAs浓度在抑郁症大鼠脑组织内显著降低。BCAAs浓度的降低会干扰脑内5-HT的释放致使出现中枢疲劳[23-24]，疲劳是抑郁症的常见症状。抑郁症患者脑组织内缬氨酸、亮氨酸水平的异常导致抑郁症患者体内5-HT和谷氨酸合成异常，最终可能引起抑郁行为的发生。

4.2.2 牛磺酸和亚硫磺酸代谢 在牛横酸和亚牛横酸代谢通路中，乙酰磷酸由磺基乙酰转化而来，并且通过乙酰转移酶和乙酰酸基酶转化为乙酰辅酶A和乙酸乙酯[25]。牛磺酸是一种重要的神经递质。当大脑缺乏牛横酸时，中枢神经系统中的GABA受体会受到严重制约，从而导致抑郁症的发生[25-27]。另外，乙酰辅酶A是能量代谢的重要中间产物，其能力缺乏而引起活动的减少是抑郁症的主要症状之一。

脑内抑制性神经递质包括GABA、甘氨酸等，其中以GABA最为重要。GABA由L-谷氨酸脱羧生成，在脑内含量丰富。GABA能神经元主要分布在大脑皮质层、小脑皮质、纹状体、黑质等区域，这些区域和情感、精神等活动都密切相关[28]。

4.2.3 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 谷氨酰胺是胶质细胞在谷氨酰胺合成酶的作用下，以谷氨酸为底物合成的，合成的谷氨酰胺再穿过胶质细胞膜转运至神经末梢，在神经末梢，在谷氨酰胺酶的分解作用下转变为神经递质谷氨酸，构成谷氨酰胺循环[29-31]。Levine等[29]利用质子核磁共振技术，对抑郁症患者的脑脊液进行检测，发现未经治疗的该病患者急性期脑脊液谷氨酰胺处于高水平。王晓艳[21]研究发现，慢性应急后，大鼠脑组织中的谷氨酰胺含量升高，并结合皮质酮和促肾上腺皮质激素的测定结果，推测谷氨酰胺含量的升高与皮质酮等激素的变化有关。

谷氨酸是中枢神经系统内最重要的一种兴奋性神经递质，主要分布在大脑皮质、海马、小脑和纹状体。在二型谷氨酸羧肽酶的作用下，由氮乙酰天冬氨酸谷氨酸（*N*-acetylaspartatyl glutamate，NAAG）转化而来[30]，或由谷氨酰胺水解生成或由葡萄糖经柠檬酸循环中间产物2-酮戊二酸转化而来。谷氨酸可调节某些神经元的突触后电位，如多巴胺神经元，进而影响神经递质的功能[31]；还能通过调节突触的效能，从而参与学习和记忆活动[32]。谷氨酸不仅对中枢系统具非常重要的作用，也是海马中重要的兴奋性突触递质。海马的传入、传出或中间神经元中，大多数都属于谷氨酸能神经元，其对突触的可塑性、学习和记忆都有着非常重要的作用。有研究结果显示，慢性应激可引起大鼠海马功能下降甚至萎缩[33]。CUMS干预引起大鼠脑组织中谷氨酸含量的降低与前期结果一致。

4.3 其他代谢途径与抑郁症

除上述物质变化外，多数氨基酸含量降低，其中赖氨酸被证明在脑组织营养方面具有非常重要的意义[34]，可推测在慢性不可预知的多种刺激的干预下，脑内一些物质的消耗要大于蛋白质分解所补充的。

4.4 展望

本实验对抑郁大鼠脑组织进行了整体的代谢分析，阐明了脑内代谢物在抑郁症发病机制的作用，为代谢组学应用于药效学评价奠定了基础。但整体组织的研究无法体现代谢组学空间性的特点，其结果比较笼统。可对脑组织进行空间分区，本课题组后续对抑郁大鼠的海马组织进行了代谢组学分析，找到了8个差异代谢物，其中谷氨酸、丙氨酸、牛磺酸、肌酐、谷氨酰胺的变化结果与本研究一致，所得结论相互相应，但在代谢物数量上少于本研究找到的差异代谢物[35]，显示出对整体组织进行研究的必要性。

当前，代谢组学的主要研究手段是通过NMR、液相色谱-质谱联用（LC-MS）、气相色谱-质谱联用（GC-MS）等分析技术获得尽可能多的内源性代谢物含量信息后，采用PCA等模式识别技术对成千上百个代谢物信息进行降维处理，通过Scoring plot方法进行组间样本的判别区分，通过Loading plot方法获得相关差异代谢物的信息，然后找到有关的代谢通路。但目前找到的差异代谢物对疾病的专属性不强[36]。显然，单纯根据Loading plot找到的差异代谢物来解析疾病的作用机制是远远不够的。因

此，如何找到特异的、专属的某一疾病的代谢通路是代谢组学目前的研究难点和热点。

稳定同位素示踪具有高效、低误差、示踪能力微观性和灵活多变的特性：可同时测定多个不同样品化合物的浓度；可标记、追踪化合物分子内部某个或多个特定原子，进而实现定性、定量测定化合物的不同代谢途径或生成过程[37-38]。因此，稳定同位素示踪的代谢组学技术是实现疾病生物标志物定量分析的有效手段，将在寻找与疾病病因、诊断及药物疗效评估相关的专属的生物标志物和代谢通路中发挥巨大潜力。整合稳定同位素示踪与MS和NMR技术将成为解密人类疾病的发生、发展及疗效预后的最有力方式之一[39]。

参考文献

[1] World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates [EB/OL]. (2017-02) [2018-08-15]. https://www. who. int / mental_health / management / depression / prevalence_ global_health_estimates/en/

[2] 李 苒, 高 杉, 李 琳, 等. 抑郁症发病机制的研究进展 [J]. 天津中医药, 2013, 30(2): 121-125.

[3] 杨钦炎, 周 敏, 罗春琼, 等. 抑郁症的诊断研究进展 [J]. 国际精神病学, 2014, 41(2): 100-102.

[4] 段冬梅, 图 娅, 陈利平, 等. 基因组学研究在抑郁症发病机制及诊断中的应用 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(5): 944-948.

[5] 曹莉莎, 张 芳, 罗 文, 等. 抑郁大鼠海马组织的比较蛋白质组学研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 3(25): 697-702.

[6] Tian J S, Xia X T, Wu Y R, et al. Discovery, screening and evaluation of a plasma biomarker panel for subjects with psychological suboptimal health state using ^{1}H-NMR-based metabolomics profiles [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33820-33831.

[7] 朱立静, 孙冰婷, 宗 阳, 等. 抑郁症组学生物标志物的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(23): 2031-2134.

[8] 陈 宇. 基于蛋白芯片技术筛选抑郁症血浆的诊断标志物 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.

[9] Nicholson J K, Wilson I D. Opinion: understanding 'global' systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2: 668-676.

[10] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: Metabonomics [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1054-1056.

[11] 颜贤忠, 赵剑宇, 彭双清, 等. 代谢组学在后基因组时代的作用 [J]. 波谱学杂志. 2004, 21(2): 263-271.

[12] Tang H R, Wang Y L. Metabonomics: A revolution in profress [J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(5): 401-407.

[13] 郑兴宇, 高晓霞, 刘晓节, 等. 基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 175-179.

[14] Liu X, Li Z Y, Li Z F, et al. Urinary metabonomic study using a CUMS rat model of depression [J]. Magn Reson in Chem, 2012, 50(2): 187-192.

[15] Liu X, Zhou Y, Li Z, et al. Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: A plasma metabonomics study based on NMR spectroscopy [J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(4): 578-588.

[16] 田俊生, 史碧云, 冯光明, 等. 慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠粪便1H-NMR代谢组学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3170-3176.

[17] 郭秉荣, 杨 岚, 刘佳丽, 等. 慢性不可预知温和应激配合孤养抑郁模型大鼠海马的代谢组学研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(14): 1160-1164.

[18] 畅洪昇, 王庆国, 石任兵, 等. 四逆散活性成分对抑郁症大鼠慢性应激模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(5): 42-45.

[19] 唐亚梅, 陈春梅, 刘 勇. CUMS抑郁模型大鼠脑组织DA、5-HT及其代谢产物的浓度变化 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2012, 9(3): 57-64.

[20] 时宝林, 郎森阳, 时霄冰, 等. 抑郁症患者脑脊液异常蛋白的表达 [J]. 中国心理卫生杂志, 2010, 24(9): 665-668.

[21] 王晓艳. 应激及其药物干预的代谢组学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2007.

[22] 欧阳儒颖. 补充支链氨基酸对大鼠精神疲劳的缓解作用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2004.

[23] Liu C C, Wu Y F, Feng G M, et al. Plasma-metabolite-biomarkers for the therapeutic response in depressed patients by the traditional Chinese medicine formula Xiaoyaosan: A ^{1}H NMR-based metabolomics approach [J]. J Affect Disorders, 2015, 185: 156-163.

[24] Blomstrand E. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue [J]. J Nutr, 2006, 136(2): 544-547.

[25] Adermark L, Jonsson S, Söderpalm B, et al. Region-specific depression of striatal activity in wistar rat by modest ethanol consumption over a ten-month period [J]. Alcohol, 2013, 47(4): 289-298.

[26] Menzie J, Pan C, Prentice H, et al. Taurine and central nervous system disorders [J]. Amino acids, 2014, 46(1): 31-46.

[27] Han X, Chesney R W. The role of taurine in renal

disorders [J]. Amino acids, 2012, 43(6): 2249-2263.

[28] Dubin M J, Mao X, Banerjee S, et al. Elevated prefrontal cortex GABA in patients with major depressive disorder after TMS treatment measured with proton magnetic resonance spectroscopy [J]. J Psychiatry Neurosci, 2016, 1: 8872147.

[29] 王 坤. 谷氨酰胺的生理功能及临床应用 [J]. 山东医药, 2006, 46 (19): 90-91.

[30] Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, et al. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients [J]. Biol Psychiatry, 2000, 47 (7): 586-593.

[31] Probert C S, Jones P R, Ratcliffe N M. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea [J]. Gut, 2004, 53(1): 58-61.

[32] Fiorillo C D, Willianm J T. Glutamate mediatea an inhibitory pestaynapfic potential in dopamine neurons [J]. Nature, 1998, 394: 78-82.

[33] Salinska E, Stafiej A. Metabotromic glutamate receptor are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release [J]. Neurochem Int, 2003, 43: 469-474.

[34] Liu X Y, Zheng P, Zhao X J, et al. Discovery and validation of plasma biomarkers for major depressive disorder classification based on liquid chromatography–mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2015, 14(5): 2322-2330.

[35] 彭国茳, 史碧云, 田俊生, 等. 京尼平抗抑郁作用的^{1}H-NMR 代谢组学机制研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(2): 209-216.

[36] 黄晓晨, 宿树兰, 郭建明, 等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考 [J]. 中草药, 2014, 42(2): 147-153.

[37] Fan T W, Lorkiewicz P K, Sellers K, et al. Stable isotope-resolved metabolomics and applications for drug development [J]. Pharmacol Therapeut, 2012, 133(3): 366-391.

[38] 高英慧, 冯一丹, 唐智言, 等. 基于稳定同位素的代谢组学临床研究进展 [J]. 生命科学研究, 2017, 21(6): 559-564.

[39] Fan T W, Lane A N. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry [J]. Prog Nucl Mag Res Sp, 2016, 92-93: 18-53.