

基于代谢组学技术的白芍养血柔肝作用机制研究

赵丹萍, 张建军, 贺 成, 王 莎, 汤如莹, 侯 燕, 王林元*

北京中医药大学, 北京 100029

摘要:目的 通过分析血虚肝郁模型大鼠血清内源性代谢物的变化, 利用代谢组学技术研究白芍对异常代谢物的调节作用, 探讨白芍养血柔肝功效的作用机制。方法 采用辐照复合慢性束缚应激方法建立大鼠血虚肝郁模型, 以液质联用为核心技术, 以主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)方法为数据分析的主要手段, 筛选出可能的生物标志物, 并分析白芍的干预机制。结果 白芍通过影响磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、神经酰胺、脱氧胞苷、甜菜碱等 21 种小分子代谢物, 对体内代谢轨迹的扰动起到一定的回调作用, 能够改善大鼠因外界刺激因素(如辐照、束缚、孤养)诱发的血虚肝郁状态。结论 白芍养血柔肝功效的作用机制可能与鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、 α -亚油酸代谢等相关代谢通路有关。

关键词: 代谢组学; 白芍; 养血柔肝; 血虚肝郁模型; 内源性代谢物; 辐照复合慢性束缚应激法; 液质联用; 主成分分析; 偏最小二乘判别分析; 生物标志物; 干预机制; 鞘脂代谢; 甘油磷脂代谢; 亚油酸代谢; α -亚油酸代谢; 代谢通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3412-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.026

Study on mechanism of nourishing blood and smoothing liver effects of *Paeoniae Radix Alba* based on metabolomics information

ZHAO Dan-ping, ZHANG Jian-jun, HE Cheng, WANG Sha, TANG Ru-ying, HOU Yan, WANG Lin-yuan

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the nourishing blood and smoothing liver effects of *Paeoniae Radix Alba* (PRA) based on metabolomics information. **Methods** The stagnation of liver *qi* and blood deficiency syndrome rats model was established by chronic restraint stress combined with radiation. Using LC/MS method as the core technology, the principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminate analysis (PLS-DA) as the main data analysis methods, endogenous metabolites were screened in the model rats to study the intervention mechanism of PRA. **Results** Through the impact of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, ceramide, deoxycytidine, betaine, and other 21 kinds of small molecular metabolites, PRA had a certain callback effect on the disturbance of metabolic trajectory, which can improve the state of stagnation of liver *qi* and blood deficiency induced by external stimulating factors (such as irradiation, restraint, and loneliness). **Conclusion** The nourishing blood and smoothing liver effects of PRA may be related to the sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism, linoleic acid metabolism, and alpha-linolenic acid metabolism.

Key words: metabolomics; *Paeoniae Radix Alba*; nourishing blood and smoothing liver; syndrome of stagnation of liver *qi* and blood deficiency; endogenous metabolites; chronic restraint stress combined with radiation; LC-MS; principal component analysis; partial least squares discriminate analysis; biomarkers; intervention mechanism; sphingolipid metabolism; glycerophospholipid metabolism; linoleic acid metabolism; alpha-linolenic acid metabolism; metabolic pathway

血虚肝郁证既有肝经血分的亏虚, 又有肝经气机的疏泄失常, 常见于虚劳、眩晕、郁证、胁痛、月经不调等许多疾病当中, 危害广泛^[1]。目前, 关

于血虚肝郁证候的本质研究相对较少, 张建军等^[2]成功建立该模型并通过药效学实验^[3-7]证明白芍对该模型动物的行为学及其生理病理变化有明显改善

收稿日期: 2017-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473370)

作者简介: 赵丹萍(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术与新制剂的研究与应用。

Tel: (010)64286099 E-mail: 20150931898@bucm.edu.cn

*通信作者 王林元(1961—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中药新技术与新制剂的研究与应用。

Tel: (010)64286099 E-mail: 13381002202@vip.163.com

作用。然而对其潜在的干预机制尚不清楚,本研究以基于中医证候的血液代谢组学^[8]研究为切入点对白芍养血柔肝功效进行小分子代谢物分析,探讨其作用机制,为血虚肝郁证候大鼠的生物学本质及白芍作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级健康雄性SD大鼠20只,体质量180~200 g,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0002。饲养于北京中医药大学SPF级动物房,室温20~22℃,相对湿度为60%~70%,灯照周期为12 h(7:00~19:00时灯照,19:00~7:00时黑暗)。实验符合相关伦理学要求。

1.2 主要仪器

Thermo Fisher DionexTM UltiMateTM 3000 超快速液相色谱、Q ExactiveTM 四极杆轨道离子阱质谱、SavantTM SPD131DDA SpeedVacTM 真空离心浓缩仪, Thermo Fisher Scientific; Mix-3000 震荡混匀器, 杭州米欧仪器有限公司; Mikro 220R 台式高速冷冻离心机, 德国 Hettich 科学仪器公司。

1.3 主要试剂

乙腈(批号157014)、甲醇(批号143711)、异丙醇(批号158629)、水(批号161714)、乙酸铵(批号172988)、甲酸(批号143711)均为质谱级, Fisher公司生产。

2 方法与结果

2.1 分组与造模方法

动物适应性喂养5 d后,将20只大鼠随机分成2个组,即空白组和模型组,每组10只。模型组每天不定时束缚3 h,连续21 d,束缚以不影响大鼠正常昼夜节律为前提,调节束缚筒长度,使动物无损伤完全固定,限制大鼠进退和掉头,以不产生压迫感,不影响呼吸和排泄为度。并于束缚7 d后即实验第8天,采用放射源全身照射1次,照射剂量为3.5 Gy,照射后大鼠继续单笼饲养,每天不定时束缚3 h,持续14 d。造模第1天白芍组ig给药白芍水提物[自制,芍药苷量为1.8%,符合《中国药典》2015年版要求(>1.2%)],剂量为2 g/kg,空白组和模型组ig等量纯水(ig容积为10 mL/kg),连续21 d。

2.2 样品采集及制备

实验第22天,大鼠腹腔麻醉后,腹主动脉取血,

3 500 r/min离心分离血浆, -80℃保存。样品预处理分为极性和非极性2部分。

2.2.1 极性部分 血清样品4℃条件下复融后,取100 μL至标记好标签的1.5 mL离心管中,加入300 μL的乙腈。充分振荡15 s,进行蛋白沉淀。4℃、13 200 r/min离心10 min,取上层溶液100 μL,置于200 μL内衬管中,待测。同时,各组吸取等量前处理后样品进行混合,制备质量控制样品(QC1)。

2.2.2 非极性部分 血清样品4℃条件下复融后,取100 μL至标记好标签的1.5 mL离心管中,加入氯仿-甲醇(3:1)600 μL,超声1 h,混匀。4℃、13 200 r/min离心10 min,取下层氯仿300 μL浓缩干燥,加入异丙醇-乙腈(1:1)400 μL复溶,超声溶解,12 000 r/min离心10 min,取上层溶液100 μL,置于200 μL内衬管中,待测。同时,各组吸取等量前处理后样品进行混合,制备质量控制样品(QC2)。

2.3 色谱条件

2.3.1 极性部分 色谱柱为 Waters UPLC BEH Amide (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(含0.1%甲酸和2 mmol/L 甲酸铵, A)和水(含0.1%甲酸和2 mmol/L 甲酸铵, B); 洗脱程序:0~1.0 min, 95% A; 1.0~7.0 min, 95%~50% A; 7.0~9.0 min, 50% A; 9.0~9.1 min, 50%~95% A; 9.1~13.0 min, 95% A; 体积流量0.3 mL/min; 进样量为1 μL; 柱温40℃。

2.3.2 非极性部分 色谱柱为 Waters UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-水(6:4, 含0.1%甲酸和2 mmol/L 甲酸铵, A)和乙腈-异丙醇(1:9, 含0.1%甲酸和2 mmol/L 甲酸铵, B); 洗脱程序:0~2.0 min, 20%~30% B; 2.0~5.0 min, 30%~45% B; 5.0~6.5 min, 45%~60% B; 6.5~12.0 min, 60%~65% B; 12.0~14.0 min, 65%~85% B; 14.0~17.5 min, 85%~100% B; 17.5~18.0 min, 100% B; 18.0~18.1 min, 100%~20% B; 18.1~19.5 min, 20% B; 体积流量0.3 mL/min; 进样量为1.0 μL; 柱温50℃。

2.4 质谱条件

质谱分析采用装备了热电喷雾离子源的四极杆轨道离子阱质谱仪。正、负离子离子源电压分别为3.7 kV和-3.5 kV。毛细管加热温度320℃。鞘气压力206.85 kPa(30 psi), 辅助气压力68.95 kPa(10 psi)。溶剂加热蒸发温度300℃。鞘气和辅助气均为氮气。碰撞气为氮气, 压力为199.95 mPa(1.5

mTorr)。一级全扫描参数为分辨率 70 000, 自动增益控制目标为 1×10^6 , 最大隔离时间 50 ms, 质荷比扫描范围 m/z 150~1 500。质谱质量轴校准采用外标法, 质量误差为 5×10^{-6} 。校准质量正离子选择 74.096 43、83.060 37、195.084 65、262.636 12、524.264 96、1 022.003 41。负离子选择 91.003 68、96.960 10、112.985 59、265.147 90、514.284 40、1 080.009 99。代谢物鉴定采用 dd-MS² 扫描模式(数据依赖扫描模式)。具体参数为分辨率 17 500, 自动增益控制目标为 1×10^5 , 最大隔离时间 50 ms, 最大 10 个离子扫描二级碎片, 动态排除。质量分离窗口 2, 碰撞能 30 V, 强度限定 1×10^5 。液质系统由 Xcalibur 2.2 SP1.48 软件控制。

2.5 数据处理

药理实验数据使用统计软件 SPSS 18.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间指标比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。液质实验数据导入 Progenesis QI 软件进行峰识别、匹配和归一化处理, 然后将筛选的数据导入 SIMCA14.1 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA), 根据 PLS-DA 模型的变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值, 并结合 t 检验的 P 值($P < 0.05$)来寻找差异性表达代谢物。

3 结果

3.1 血清代谢物的典型色谱图

采用“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件, 分别对各组血清样品进行正、负离子模式下的分离检测, 但检测时发现极性部分正、负离子模式下峰强度及峰数目基本一致, 最终极性部分选择正离子采集模式, 非极性部分选择正、负 2 种采集模式。同时, 在分析过程中, 为了保证方法及仪器的稳定, 每 6 个样品插入 1 个 QC 样品。对照组、模型组和 QC 样品的典型总离子流图(TIC)如图 1~3 所示。可以看出 3 组的 TIC 图在同一保留时间段色谱峰大小、高低具有一定差异。且 QC 样品重复性良好。

3.2 PCA

空白组和模型组大鼠血清的 PCA 图见图 4~6, 从图中可以看出 2 组各自聚集, 无明显交叉重叠, 说明 2 组样本间血浆代谢图谱存在显著差异。通过计算本实验中非极性部分正离子模式 R_X^2 等于 0.904 6, 负离子模式 R_X^2 等于 0.820 1, 极性部分正

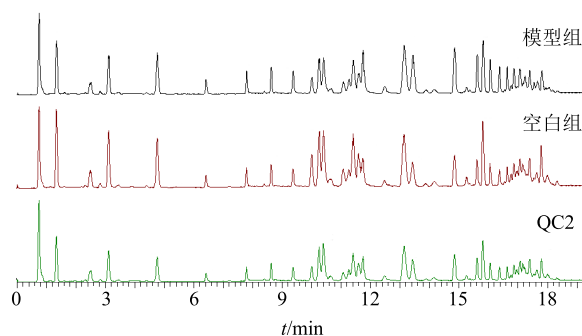


图 1 空白组和模型组血清非极性部分正离子 TIC 图
Fig. 1 Typical TIC of serum nonpolar ESI⁺ in control group compared with model group

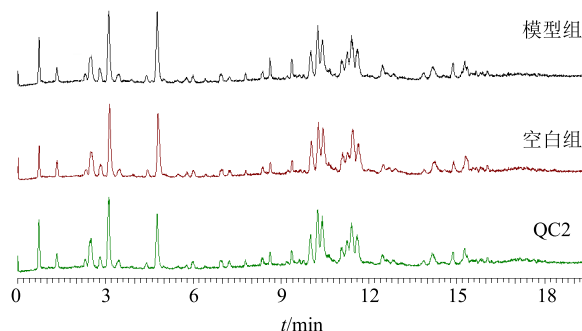


图 2 空白组和模型组血清非极性部分负离子 TIC 图
Fig. 2 Typical TIC of serum nonpolar ESI⁻ in control group compared with model group

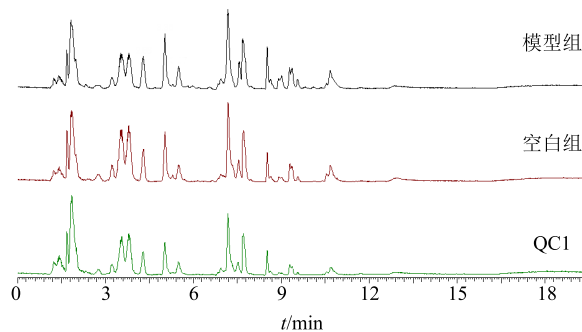


图 3 空白组和模型组血清极性部分正离子 TIC 图
Fig. 3 Typical TIC of serum polar ESI⁺ in control group compared with model group

离子模式 R_X^2 等于 0.882 0, 说明该 PCA 模型能可靠解释样本间的代谢差异。

3.3 PLS-DA

3.3.1 血虚肝郁模型大鼠与正常大鼠比较 正常组和模型组大鼠血清的 PLS-DA 分析图见图 7~9。从图中可以看出模型组与正常组得到了良好的分离, 并且计算结果显示, 非极性部分正离子模式 R_Y^2 等于 0.809 9, 负离子模式 R_Y^2 等于 0.859 0, 极性部分正离子模式 R_Y^2 等于 0.944 0, 表明该模型具有良好的拟合度和预测能力。

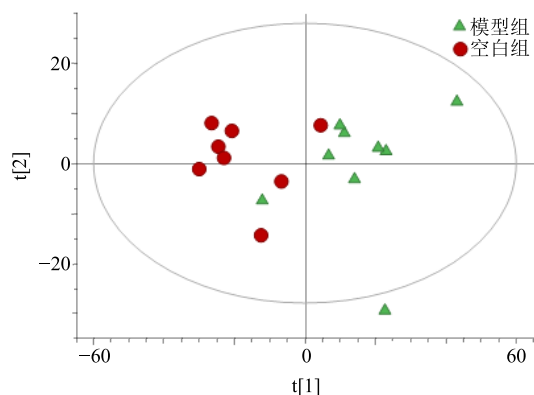


图 4 空白组和模型组血清非极性部分正离子 PCA 得分图
Fig. 4 Score plot of PCA of serum nonpolar ESI^+ in control group compared with model group

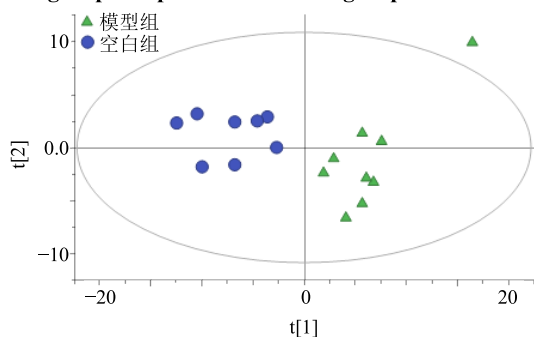


图 5 空白组和模型组血清非极性部分负离子 PCA 得分图
Fig. 5 Score plot of PCA of serum nonpolar ESI^- in control group compared with model group

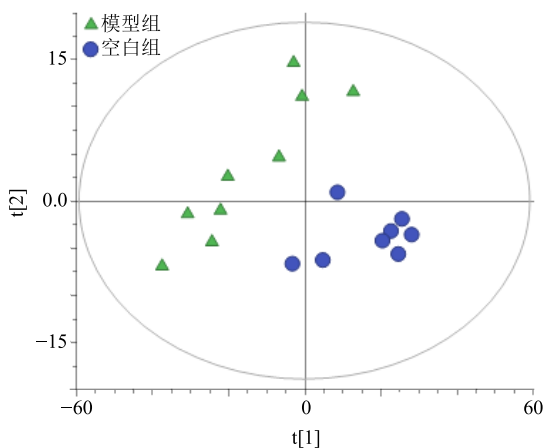


图 6 空白组和模型组血清极性部分正离子 PCA 得分图
Fig. 6 Score plot of PCA of serum polar ESI^+ in control group compared with model group

3.3.2 白芍对血虚肝郁模型大鼠的影响 在空白组和模型组进行的 PLS-DA 分析基础上,对给药组(白芍组)和上述 2 组进行比较,分析白芍的干预作用。白芍组、空白组和模型组大鼠血清的 PLS-DA 分析图见图 10~12。从图中可以看出 3 个组间基本分离,

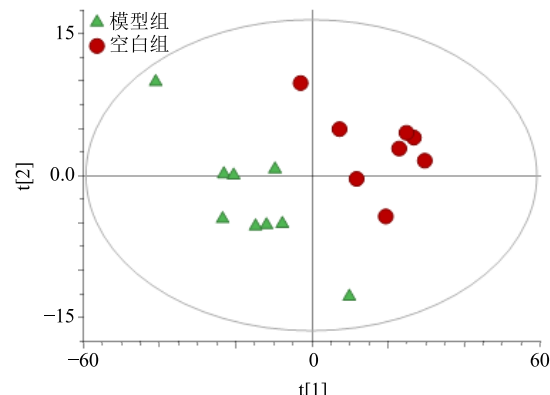


图 7 空白组和模型组血清非极性部分正离子 PLS-DA 得分图

Fig. 7 Score plot of PLS-DA of serum nonpolar ESI^+ in control group compared with model group

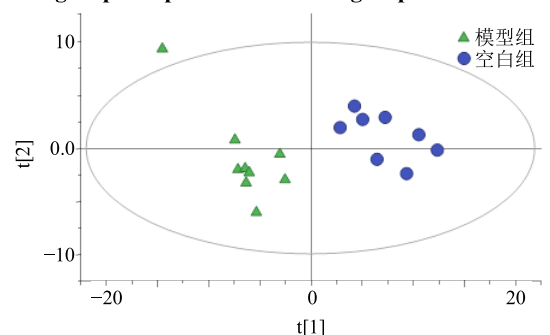


图 8 空白组和模型组血清非极性部分负离子 PLS-DA 得分图

Fig. 8 Score plot of PLS-DA of serum nonpolar ESI^- in control group compared with model group

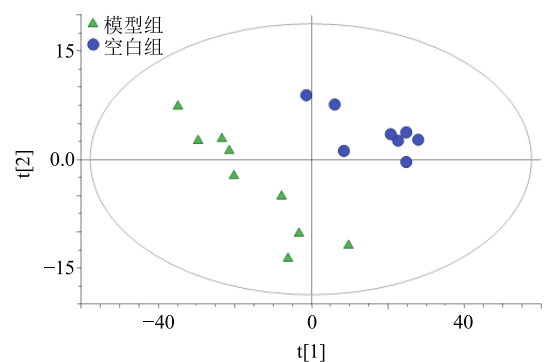


图 9 空白组和模型组血清极性部分正离子 PLS-DA 得分图
Fig. 9 Score plot of PLS-DA of serum polar ESI^+ in control group compared with model group

白芍组有向正常组回调的趋势。说明白芍在一定程度上能够促进血虚肝郁模型大鼠血清中小分子代谢物向正常水平回调。

3.4 潜在生物标志物的鉴定

将 VIP 值 >1 , 其中置信区间比较大的变量排

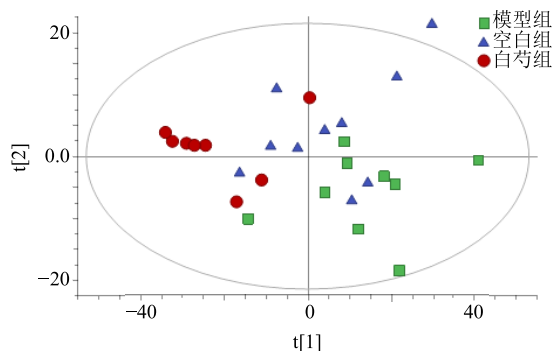


图 10 模型组、白芍组、空白组血清非极性部分正离子 PLS-DA 得分图

Fig. 10 Score plot of PLS-DA of serum nonpolar ESI⁺ in control group compared with model group and PRA group

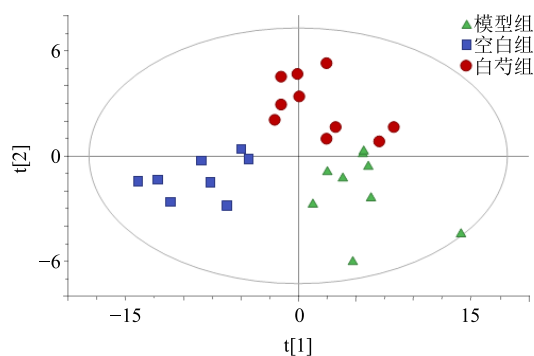


图 11 模型组、白芍组、空白组血清非极性部分负离子 PLS-DA 得分图

Fig. 11 Score plot of PLS-DA of serum nonpolar ESI⁻ in control group compared with model group and PRA group

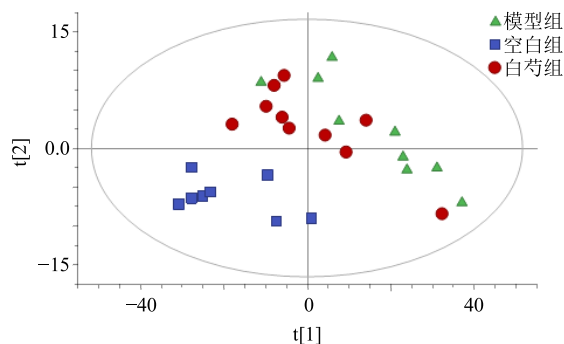


图 12 模型组、白芍组、空白组血清极性部分正离子 PLS-DA 得分图

Fig. 12 Score plot of PLS-DA of serum polar ESI⁺ in control group compared with model group and PRA group

除出候选物之列,并结合峰面积 t 检验的 P 值 ($P < 0.05$) 来寻找差异性表达代谢物,根据所寻找的差异代谢物相对分子质量,在相应数据库 HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca>) 和 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 查询。最终初步确定

了以磷脂酰胆碱 (PC)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、神经酰胺、吡啶乙醛、甜菜碱为主的 21 种具有显著差异的潜在生物标志物,结果见表 1。

3.5 代谢通路分析

将所筛选得到的潜在生物标志物输入 Metabo Analyst 网站 (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>) 中进行通路分析,以 Impact 值大于 0.1 选为潜在相关代谢通路,结果显示这些生物标志物共涉及到 4 条通路,分别是鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、 α -亚油酸代谢,结果见图 13。

4 讨论

血虚肝郁证是肝血虚与肝郁气滞并存的复合证候。李艳霞等^[3-4]、朱映黎等^[5]、王景霞等^[6-7]研究表明血虚肝郁证涉及体内神经-内分泌-免疫网络系统的变化,传统药理学研究通常是少数几个或单一因素来进行研究,缺乏整体、综合分析。代谢组学技术采用一种全景式的研究理念,客观认识机体生理和病理变化的实质,系统化地描述机体全局性代谢网络^[8-11]。本课题采用代谢组学技术对大鼠血清代谢差异物进行了研究,并探讨了白芍对血虚肝郁证大鼠代谢物的作用机制。

本实验中,为对大鼠血清中的代谢物进行全面整体地分析,在样品前处理时分成了极性和非极性 2 部分。通过整理分析,推测血虚肝郁模型大鼠存在鞘脂代谢异常、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢和 α -亚油酸代谢异常等多方面的变化。

4.1 鞘脂代谢异常

神经酰胺是鞘磷脂信号途径的中心分子,调节细胞增殖、凋亡、分化等过程;在鞘磷脂合成途径中起关键调节作用,是重要的细胞间信号分子^[12]。文献研究表明^[13-14],血虚证动物模型的表现包括了骨髓细胞凋亡,本实验中神经酰胺量的变化提示血虚肝郁模型大鼠体内存在鞘脂代谢异常。神经酰胺可以转换成鞘氨醇和鞘磷脂类^[15],在本实验中,模型大鼠体内鞘氨醇磷脂 (SM) 量降低,表明可能是由于血虚肝郁状态诱发了鞘磷脂类的消耗。白芍能够上调大鼠血清中神经酰胺及鞘氨醇磷脂量,推测其通过调节鞘脂代谢途径发挥养血柔肝的作用。

4.2 甘油磷脂代谢、亚油酸代谢和 α -亚油酸代谢异常

PC 是磷脂的一种,是细胞膜脂质双层结构的主要成分,也细胞内外环境进行物质交换通道,在细胞膜融合、胞饮作用、膜运转作用及膜中酶的催化

表 1 潜在生物标志物
Table 1 Summary of potential biomarkers

试验号	VIP	m/z	t _R /min	化合物	模型组	白芍组	采集模式
1	4.96	826.560 7	10.275	磷脂酰胆碱 (PC [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/16:0])	↓	↑	ESI ⁻ (非极性部分)
2	1.55	856.689 4	15.463	葡萄糖神经酰胺 (glucosylceramide)	↑	↓	ESI ⁻ (非极性部分)
3	2.24	319.227 9	2.809	雄甾烯醇 (androstenol)	↓	↑	ESI ⁻ (非极性部分)
4	6.10	496.339 2	3.118	溶血磷脂酰胆碱 (LysoPC (16:0))	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
5	6.95	758.568 0	10.414	磷脂酰胆碱 (PC [18:2(9Z,12Z)/16:0])	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
6	3.29	815.699 2	15.254	鞘氨醇磷脂 (SM [d18:0/24:1(15Z)])	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
7	1.70	695.572 8	17.786	胆固醇酯 (CE [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)])	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
8	1.24	650.644 1	16.034	神经酰胺 (ceramide (d18:1/24:0))	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
9	1.07	879.739 9	17.385	甘油三酯 (TG [18:0/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z)][iso6])	↓	↑	ESI ⁺ (非极性部分)
10	2.61	585.269 9	0.812	胆红素 (bilirubin)	↑	↓	ESI ⁺ (极性部分)
11	1.33	415.210 9	0.852	依普利酮 (eplerenone)	↑	↓	ESI ⁺ (极性部分)
12	1.16	345.186 3	0.910	2-乙氧基萘 (2-ethoxynaphthalene)	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
13	2.09	433.238 6	0.919	3-[4-羟基-3-(3-甲基-2-丁烯基)苯基]-2-丙烯醛 {3-[4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2-propenal}	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
14	4.94	782.567 5	1.129	磷脂酰胆碱 (PC [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/16:0])	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
15	1.89	476.305 5	1.214	奈替米星 (netilmicin)	↑	↓	ESI ⁺ (极性部分)
16	3.67	703.573 2	1.851	鞘氨醇磷脂 (SM [d18:0/16:1(9Z)])	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
17	1.47	510.354 8	2.444	溶血磷脂酰乙醇胺 (LysoPE (0:0/20:0))	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
18	8.07	524.370 0	2.368	溶血磷脂酰胆碱 (LysoPC (18:0))	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
29	1.47	455.187 6	3.660	脱氧胞苷 (deoxycytidine)	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
20	1.51	160.075 5	3.531	吲哚乙醛 (indoleacetaldehyde)	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)
21	1.77	118.086 3	4.775	甜菜碱 (betaine)	↓	↑	ESI ⁺ (极性部分)

与正常对照组比较: “↑” 代表上调, “↓” 代表下调
“↑” up-regulated, “↓” down-regulated vs control group

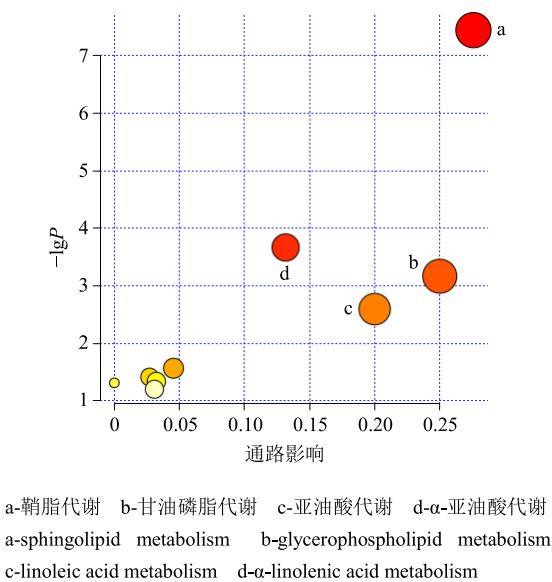


图 13 代谢通路分析
Fig. 13 Metabolic pathway analysis

活性等方面起着重要的作用^[16]。在本实验中,模型组大鼠体内 PC 量明显降低,而白芍能明显升高其量,这就提示甘油磷脂代谢、亚油酸代谢和 α-亚油酸代谢是白芍作用机制的信号通路之一。PC 是乙酰胆碱前体,其在体内经相关酶水解生成胆碱,水解胆碱随着血液循环送入大脑,再经体内乙酰化酶作用与乙酰辅酶 A 反应,生成乙酰胆碱。本实验中模型组大鼠体内 PC 量明显降低,进而会导致乙酰胆碱量减低,引起血虚肝郁模型大鼠中枢神经系统的异常,出现腺体分泌及改善记忆等效应,这与本课题组的前期实验结果一致^[3]。另外 PC 在磷脂酶 A2 和胆固醇酰基转移酶作用下可以形成 LPC,本实验中,模型组大鼠体内 LPC 量均明显降低,一方面可能是由于 PC 量的减低,另一方面也存在磷脂酶 A2 和胆固醇酰基转移酶的活性均降低。但相关文献报道称^[17-18]慢性温和不可预知应激 (CUMS) 诱导的

抑郁模型大鼠体内胆固醇酰基转移酶活性降低,而磷脂酶 A2 活性增强,分析与本实验结果不一致的原因可能是本研究采用辐照和慢性束缚应激复制大鼠血虚肝郁证候模型,存在造模方法、模型的不同。

4.3 其他(吲哚乙醛、脱氧胞苷和甜菜碱)异常

吲哚乙醛属于 3-烷基吲哚类化合物,参与体内色氨酸代谢。色氨酸是神经递质 5-羟色胺(5-HT)的前体,经色氨酸羟化酶作用生成 5-羟基色氨酸(5-HTP),进一步脱羧生成 5-HT,最终代谢生成 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)^[19]。实验结果显示模型组吲哚乙醛量减低,提示存在色氨酸代谢的异常,这也与前期生理生化指标结果相吻合,出现 5-HT、5-HIAA 等神经递质量的改变^[3]。文献报道^[9]抑郁模型大鼠体内存在核苷酸代谢异常,本实验结果与文献报道一致。甜菜碱是 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的重要前体,参与调节了许多代谢反应,为细胞提供甲基、亚氨基、氨基、氨烷基、糖基和脱氧腺苷等物质。SAM 的甲基化与单胺类神经递质(如肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、血清素和组胺等)的合成及活化有关^[20],且研究表明抑郁模型大鼠体内甜菜碱的量减低^[21]。本实验中,模型组大鼠体内吲哚乙醛、脱氧胞苷和甜菜碱量降低,白芍能够回调大鼠血清中上述 3 种小分子代谢物趋于正常水平。

综上,本研究从内源性代谢物变化的角度初步探讨了血虚肝郁证候模型大鼠的发病机制及白芍养血柔肝的作用机制,结果提示白芍的作用机制可能与调节鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢和 α -亚油酸代谢及吲哚乙醛、脱氧胞苷、甜菜碱生成等多条信号通路有关,为未来开展白芍基于传统功效的多成分、多靶点研究奠定了基础。

志谢:北京中医药大学科研实验中心李伟实验师对本实验指导帮助。

参考文献

- [1] 李灿东,吴承玉. 中医诊断学·十二经 [M]. 第3版. 北京:中国中医药出版社,2012.
- [2] 张建军,李艳霞,王景霞,等. 辐照结合束缚应激致血虚肝郁大鼠证候模型的建立 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2176-2179.
- [3] 李艳霞,张建军,王景霞,等. 芍药苷对血虚肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴和单胺类神经递质的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(8): 2591-2595.
- [4] 李艳霞. 芍药苷对血虚肝郁模型大鼠 NO/cGMP 信号通路的调节作用 [D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [5] 朱映黎,张建军,王景霞,等. 芍药苷对血虚肝郁证模型大鼠海马 cGMP 含量及其合成与水解酶的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 818-820.
- [6] 王景霞,张建军,屈胜胜,等. 芍药苷对血虚肝郁证候模型大鼠海马 CA3 区组织形态及一氧化氮通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(2): 85-88.
- [7] 王景霞,张建军,李伟,等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 183-184.
- [8] 刘俊超,刘丹,贾银芝,等. 莫诺苷对晚期糖基化终末产物诱导人脐静脉内皮细胞损伤的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2674-2681.
- [9] 李金兵,李翼鹏,田俊生,等. 基于慢性温和不可预知应激模型内源性代谢物变化探讨抑郁症病理机制 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 108-115.
- [10] 李艺,范玛莉,邢婕,等. 龟龄集中细辛特殊炮制工艺的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2385-2393.
- [11] 王雪洁,李震宇,薛水玉,等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1727-1737.
- [12] 陈路芳,卢小东,邵启祥,等. 神经酰胺的功能及其在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 生命科学, 2014, 26(7): 725-731.
- [13] 郭平,郭霞. 四物汤对辐射致血虚证模型小鼠骨髓细胞 IL-4R 和 IL-7R 基因表达的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(6): 526-527.
- [14] 陆施婷. 血虚证实验动物造模及其证候的检测与评价 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(3): 127-131.
- [15] 金道忠,朱兴族. 神经酰胺代谢及凋亡信号调节 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 481-486.
- [16] 胡小中. 磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理 [J]. 粮油食品, 2011, 19(4): 42-44.
- [17] Bilici M, Efe H, Uydu H A, et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments [J]. *J Affective Disord*, 2001, 64(1): 43-51.
- [18] Maes M, Delange J, Ranjan R, et al. Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: Modulation by psychotropic drugs [J]. *Psychiatry Res*, 1997, 66(1): 1-11.
- [19] 张将,唐爱国. 色氨酸及其代谢产物检测的临床应用 [J]. 实验预防医学, 2012, 19(4): 633-635.
- [20] 王宏梅. S-腺苷甲硫氨酸治疗精神神经系统疾病的现状与前景 [J]. 国外医学: 老年医学分册, 2007, 28(2): 91-94.
- [21] Zhou Y Z, Lu L L, Qin X M, et al. Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 236-244.