

基于 LC-MS 技术的柴胡石油醚部位对抑郁症模型大鼠海马组织的代谢组学研究

梁梅丽^{1,2}, 赵芳¹, 方媛¹, 田俊生^{1,3}, 秦雪梅^{1,3}, 高晓霞^{1,3*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西大学 地产中药功效质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要:目的 柴胡石油醚部位具有显著的抗抑郁活性, 研究抑郁症模型大鼠给予柴胡石油醚部位后海马组织的代谢物谱, 明确其发挥药效的代谢调控通路。方法 采用基于 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 代谢组学方法研究海马组织的整体代谢轮廓, 分析柴胡石油醚部位抗抑郁作用的代谢调控机制。结果 柴胡石油醚部位通过调节氨基酸代谢和能量代谢改善抑郁状态, 但对正常机体海马组织的代谢轮廓并未产生显著影响。结论 为柴胡石油醚部位抗抑郁作用潜在分子机制的研究提供了借鉴。

关键词: 柴胡; 抗抑郁; 海马; LC-MS; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2291-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.009

Hippocampus metabolomic research on antidepressant mechanism of petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix* by LC-MS in rats

LIANG Mei-li^{1,2}, ZHAO Fang¹, FANG Yuan¹, TIAN Jun-sheng^{1,3}, QIN Xue-mei^{1,3}, GAO Xiao-xia^{1,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Key Laboratory of Active constituents Research and Utilization of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective The petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix* has an antidepressant effect and this study aimed to explore the regulated mechanism of the petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix* based on hippocampus metabolic profiles. **Methods** Hippocampus metabolic profiles were obtained by UHPLC-Q Exactive Orbitrap-MS. **Results** The results demonstrated that the petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix* had an antidepressant effect by regulating amino acid metabolism and energy metabolism, while it had no significant effect on hippocampus metabolic profiles of healthy rats. **Conclusion** The obtained results provide a reference for potential molecular mechanism of antidepressant effect of the petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix*.

Key words: *Bupleuri Radix*; antidepressant; hippocampus; LC-MS; metabolomics

抑郁症是一种慢性、常发、主要以心境低落为特征的精神性疾病, 如今影响着全球 3.5 亿人口, 被世界卫生组织 (WHO) 列为社会最沉重的疾病之一^[1-2]。化学合成药物治疗抑郁症效果显著, 但毒副作用多, 如精神运动障碍、依赖性等^[3]。传统中药因其作用温和、毒副作用少, 成为科研工作者的研究热点。

本课题组前期对经典抗抑郁名方逍遥散各部位进行药理活性研究, 筛选出了石油醚活性部位, 其对抑郁症的疗效优于原方^[4]。进一步对其有效部位进行药动学-药效学相关性研究, 体内过程研究发现其主要入血成分为柴胡的多炔类成分^[5], 体现了柴胡在逍遥散复方中的君药地位。

收稿日期: 2018-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473415); 山西省应用基础研究优秀青年基金会项目 (201701D211009); 山西省高校优秀创新团队项目

作者简介: 梁梅丽 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药代谢组学。Tel: 18234124779 E-mail: liangml02@163.com

*通信作者 高晓霞, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药代动力学与代谢组学研究。Tel: (0351)7019297 E-mail: gaomiaoxia@sxu.edu.cn

柴胡 *Bupleuri Radix* 是伞形科植物北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Wild. 的干燥根,被《神农本草经》列为上品,具有疏肝解郁、清热、益气等功效^[6],主要用于治疗流感、发烧、疟疾、肝炎等^[7-10],也常作为传统抗抑郁中药复方的君药,如逍遥散、柴胡疏肝散^[4,11]。现代研究表明柴胡中皂苷类、黄酮类及多糖类成分具有显著的药理活性^[12-13],此外,课题组前期从柴胡中分离出 8 种多炔类化合物,体外活性实验结果表明 8 种多炔类化合物具有对神经突触再摄取单胺递质的抑制作用,表现出显著抗抑郁活性^[14-15]。随后,课题组进一步对柴胡石油醚部位在慢性不可预知温和应激(CUMS)模型大鼠和正常大鼠的病理、生理状态下的药效和毒性反应研究中发现,柴胡石油醚部位在中、高剂量具有显著的抗抑郁活性,且未对 CUMS 大鼠产生明显的肝肾损伤影响,但在高剂量下对正常大鼠产生轻微的肝肾损伤^[16],该研究结果体现了中医理论“有故无殒”的思想。大脑海马结构是与情绪和认知关系密切的重要脑区,抑郁障碍在其病因、病理生理过程以及治疗方面与海马结构有着密切的联系^[17],而目前对柴胡石油醚部位抗抑郁活性的代谢调控机制尚不明确,因此,有必要研究柴胡石油醚部位抗抑郁活性的海马组织代谢调控通路。

代谢组学是系统生物学的一部分,也已成为系统生物学中强有力的研究方法,其重点是根据尿液、血液或组织等生物样品中的整体内源性代谢物谱,对外界刺激如药物、疾病或环境等所引起的生物体系的内源性代谢物反应进行全面研究,为潜在生物标志物的寻找,关键代谢途径的发现和药物发挥药效的潜在疗效机制的洞察提供了平台^[18-19]。目前,LC-MS 以其分析速度快、分辨率高、灵敏度高等优点成为代谢组学研究的主流^[20-21]。因此,本实验将采用基于 LC-MS 代谢组学方法研究柴胡石油醚部位抗抑郁活性的海马组织代谢轮廓,明确其发挥药效的代谢调控通路。

1 材料与仪器

1.1 仪器与试剂

Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱及四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪、Xcalibur 工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MX-S 可调式混匀仪(美国 Scilogex 公司);Neofuge13R 高速冷冻离心机(力康公司);电子分析天平 BS210S

(南京莱步科技实业有限公司);SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

LC-MS 级乙腈、HPLC 级甲酸(Thermo Fisher Scientific 公司);纯化水(屈臣氏集团有限公司)。

1.2 实验动物

成年雄性 SD 大鼠 136 只,SPF 级,体质量(200±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001。动物饲养温度为 23~27℃,湿度 30%~70%,自然昼夜节律光照,适应 1 周后进行实验。

1.3 药物及制备

同课题组前期文献报道^[16],柴胡购自山西省华阳药业有限公司,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* Wild.,留样于山西大学中医药现代研究中心。柴胡饮片 5 kg 用 95%乙醇浸泡 12 h,回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,回收乙醇至无醇味,加水分散,浓缩至浸膏,加入等体积的石油醚超声萃取(30 min/次),至萃取液近乎无色。合并石油醚提取液,回收溶剂,浓缩至浸膏,于真空干燥箱(60℃)中干燥,得柴胡石油醚部位(150 g)。所得干燥柴胡石油醚部位用 0.5%羧甲基纤维素钠-0.5%聚山梨酯-80 水溶液溶解,制备得到 7 个不同质量浓度(D1~D7,按生药量计 0.1、0.3、0.6、1.25、2.5、5.0、10.0 g/mL)灌胃液。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

根据课题组前期研究^[16],将 136 只 SD 大鼠随机分为 17 组($n=8$),即对照组、CUMS 模型组、模型大鼠柴胡石油醚部位 7 个剂量(C1~C7)给药组、盐酸文拉法辛组(CY, 3.5 mg/mL),正常大鼠柴胡石油醚部位 7 个剂量(Z1~Z7)给药组。CUMS 造模参考文献报道方法^[22],模型、C1~C7 及 CY 组大鼠采用单只孤养并对其造模 21 d,C1~C7 及 CY 组造模同时 ig 给药。对照及 Z1~Z7 组大鼠以每笼 4 只饲养,Z1~Z7 组大鼠 ig 给药,持续 21 d。对照及模型组大鼠 ig 给予等剂量空白溶剂,各组大鼠给药体积为 10 mL/kg,每日给药 1 次。

2.2 样本采集、预处理及制备

第 21 天末次给药 1 h 后采用股动脉取血致大鼠死亡后迅速于冰袋上解剖大脑,取海马组织并称定质量,迅速放入液氮冷冻,于-80℃冰箱下保存备用。

课题组前期研究^[16]表明,柴胡石油醚部位 D4~

D7 剂量具有抗抑郁作用, 正常大鼠给予 D5~D7 剂量时具有轻微的肝肾毒性。参照文献报道^[1], 从 -80 ℃ 冰箱取出对照、模型、C4、C6、C7、Z4、Z6 和 Z7 组大鼠海马组织并于 4 ℃ 下解冻后, 精密称取 0.02 g, 加入 0.4 mL 预冷 0.2% 甲酸乙腈, 于冰中匀浆, 在 4 ℃ 下以 15 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液约 400 μL, 氮气吹干。加入 50 μL 0.1% 甲酸水乙腈 (9:1), 复溶, 在 4 ℃ 下以 15 000 r/min 离心 10 min, 上清液待进样 LC-MS。

2.3 质控 (QC) 样本制备

从“2.2”项下每个待测海马样品中取出匀浆液 10 μL, 混匀, 按“2.2”项下方法制备 QC 样品。在样本进样分析过程中, 每进 8 针样品进一针 QC 样品, 以监测 LC-MS 系统稳定性。

2.4 LC-MS 分析条件

2.4.1 色谱条件 以 Dionex UltiMate 3000 UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS 按如下参数设置进行数据采集: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱, 流动相 A (水, 含 0.1% 甲酸)-B (乙腈, 含 0.1% 甲酸), 流动相梯度为 0~2 min, 2% B; 2~3 min, 2%~35% B; 3~17 min, 35%~70% B; 17~18 min, 70% B; 18~29 min, 70%~98% B; 29~31 min, 98% B; 31~33 min, 98%~2% B; 33~35 min, 2% B。体积流量 0.2 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 40 ℃。

2.4.2 质谱条件 采用 HESI 离子化方式, 喷雾电压正极 3.5 kV, 负极 2.5 kV。毛细管温度 320 ℃, 加热器温度 300 ℃, 鞘气体积流量 35 arb, 辅助气体体积流量 10 arb。扫描模式为 Full Scan/dd-MS2, 采集范围为 m/z 100~1 500, 正负离子切换采集模式。分辨率采用 MS Full Scan 35 000 FWHM, MS/MS 17 500 FWHM, 碰撞能量为 12.5、25、37.5 eV。

2.5 数据处理

将采集所得的 LC-MS/MS 数据原始文件导入 Compound Discoverer 2.0 软件 (Thermo Fisher 公司, 美国), 以获取匹配和对齐的峰值数据, 设置参数如下: 质量范围 100~1 500, 质量偏差 5×10^{-6} ; 保留时间偏差 0.05 min; 信噪比阈值 1.5。将得出含保留时间 (t_R)、分子式、精确相对分子质量及峰面积信息的峰值数据导入 Excel 进行峰面积归一化, 最后将峰面积归一化后的数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics 公司, 瑞典) 进行偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判

别分析 (OPLS-DA)。同时结合 S-plot 图中的 VIP > 1 和独立样本 t 检验的 $P < 0.05$ 筛选贡献最大的差异性变量。

通过 HMDB 数据库并结合二级碎片离子对差异性变量进行鉴定指认, 将鉴定所得差异代谢物数据通过 Metabo Analyst 3.0 进行通路富集分析和利用 KEGG 在线数据库以及相关文献报道对差异代谢物所涉及的相关代谢通路进行分析。

3 结果

3.1 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 仪器系统稳定性监测结果

用 PLS-DA 对 QC 样本进行了聚类分析并对 8 针 QC 样品分别提取 10 个离子, 分别计算 10 个离子的 t_R 和质荷比 (m/z) 的 RSD 值, 用来监督 LC-MS 系统的稳定性。结果显示, QC 样品聚集在一起, 10 个提取离子 t_R 的 RSD 为 0.05%~3.43%, m/z 的 RSD 为 3.84×10^{-7} ~ 8.35×10^{-7} , 结果表明本研究所建立的分析方法的重复性和稳定性符合大批量海马组织样本代谢组学分析要求。

3.2 抑郁症模型大鼠给药后代谢组学研究

采用 UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS 方法对照、模型、C4、C6 和 C7 组大鼠海马组织样品进行数据采集, 得到各组内源性代谢物轮廓 (图 1)。为了更直观地了解各组代谢物轮廓的差异, 本研究采用 PLS-DA 对以上各组样本数据进行主成分分析 (PCA)。PLS-DA 得分图显示模型组 and 对照组明显分开, 表明抑郁症疾病对机体海马组织内源性代谢轮廓产生了影响。C4、C6、C7 组也均与模型组明显分开。其中, C6、C7 组与模型组分离较明显, 且更趋于对照组 (图 2-A、C、E), 表明柴胡石油醚部位给药对抑郁模型大鼠海马组织代谢轮廓具有一定的调控作用。模型参数 R^2_Y 表示数据对模型的解释能力, Q^2_Y 表示模型预测的准确性。模型、对照和 C4 组 PLS-DA 模型的 $R^2_Y=0.960$, $Q^2_Y=0.637$ (图 2-A); 模型、对照和 C6 组 PLS-DA 模型的 $R^2_Y=0.925$, $Q^2_Y=0.433$ (图 2-C); 模型、对照和 C7 组 PLS-DA 模型的 $R^2_Y=0.964$, $Q^2_Y=0.573$ (图 2-E), 以上模型参数表明 PLS-DA 模型能够准确地描述数据。为了验证模型可靠性, 对以上模型数据进行 200 次随机排列实验, 结果表明, R^2 与 Q^2 参数接近, 模型斜率稍大且与纵轴截距为负值, 表明模型未产生过分拟合, 而是反映了所产生的代谢变化, 表明模型可靠 [截距: $R^2=0.832$, $Q^2=$

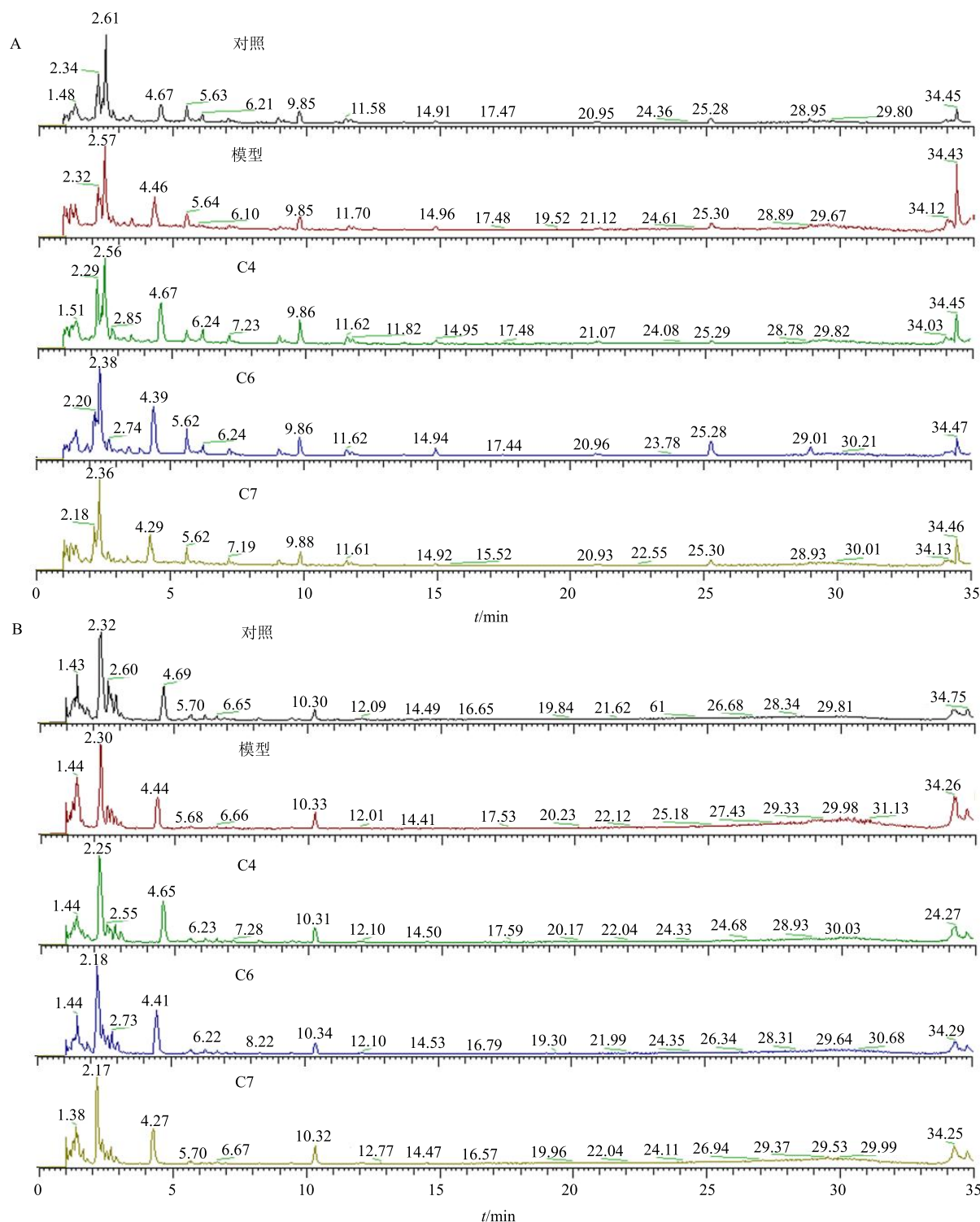


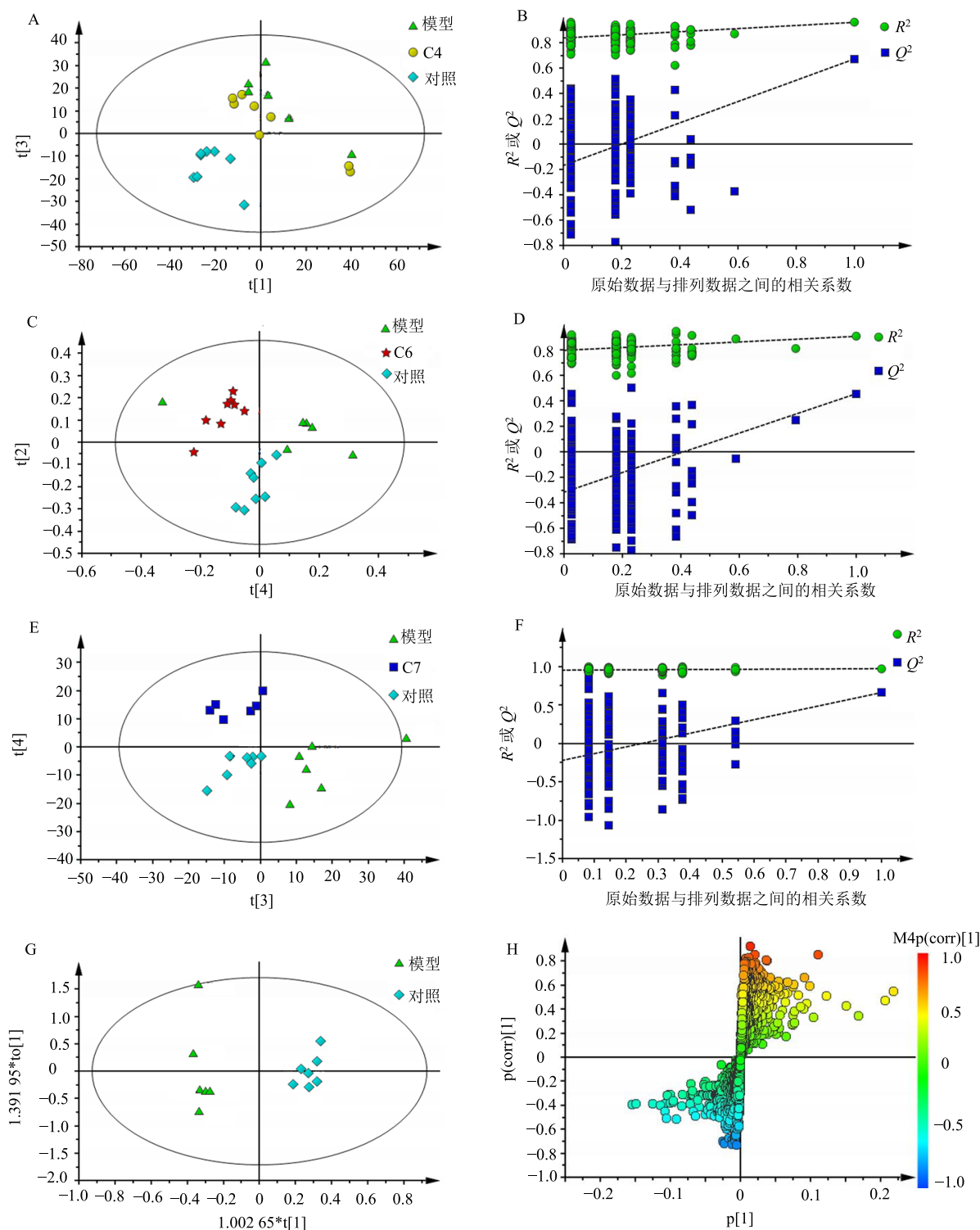
图 1 对照、模型及 C4、C6、C7 组大鼠海马样品 UPLC-MS 正 (A)、负 (B) 离子模式总离子流图

Fig. 1 UPLC-MS total ion chromatograms of hippocampus samples of rats in control group, model group, C4 group, C6 group, and C7 group in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

-0.142 (图 2-B); $R^2=0.802$, $Q^2=-0.317$ (图 2-D); $R^2=0.950$, $Q^2=-0.207$ (图 2-F)]。

为了寻找到与抗抑郁症相关的潜在生物标志

物, 首先对模型和对照组数据进行 OPLS-DA 分析, 以剔除与实验无关信息, 筛选出与抑郁症相关的差异变量。其次, 分别对各给药组 (C4、C6 和 C7 组)



A、B-对照、模型和 C4 组的 PLS-DA 得分图及其模型验证图 C、D-对照、模型和 C6 组的 PLS-DA 得分图及其模型验证图 E、F-对照、模型和 C7 组的 PLS-DA 得分图其模型验证图 G、H-对照、模型组的 OPLS-DA 得分图及 S-plot 图

A, B-PLS-DA score plot and model verification diagram of control group, model group, and C4 group C, D-PLS-DA score plot and model verification diagram of control group, model group, and C6 group E, F-PLS-DA score plot and model verification diagram of the control group, model group, and C7 group G, H-OPLS-DA score plot and S-plot of control group and model group

图 2 各组大鼠海马组织差异代谢轮廓的 PCA

Fig. 2 Results of multiple pattern recognition of hippocampus metabolic profile of rats in each group

与模型进行 OPLS-DA 分析以筛选与药效相关的差异变量。OPLS-DA 得分显示,模型和对照组能够显著分离(图 2-G),表明抑郁症机体代谢轮廓发生了显著改变,结合 OPLS S-plot 图筛选出贡献最大的差异变量(图 2-H)。

对抑郁症和柴胡石油醚部位药效相关的海马组织差异变量通过 HMDB 数据库进行鉴定指认。共指认出 7 个差异代谢物(表 2),采用受试者操作特征(ROC)曲线进行分析。结果(图 3)表明,7 个差异代谢物的 ROC 曲线下面积(AUC)均>0.8,说明这 7 个差异代谢物对 CUMS 抑郁症

诊断具有参考价值。其中,与对照组比较,模型组大鼠海马组织 *L*- α -氨基丁酸(*L*- α -aminobutyric acid)、亮氨酸(leucine)、异亮氨酸(isoleucine)、羟基异己酸(hydroxyisocaproic acid)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、黄嘌呤(xanthine)和顺乌头酸(*cis*-aconitic acid)显著降低(图 4-A),给药后这些差异代谢物均能显著回调并趋于对照组水平(图 4-B),表明柴胡石油醚部位对抑郁模型大鼠海马组织的代谢轮廓具有一定的调控作用。结合 KEGG 数据库以及相关文献报道^[11]对 7 个差异代谢物进行代谢通路分析(图 5),这些差异代谢物

表 2 与柴胡石油醚部位抗抑郁作用相关的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites related to antidepressant effect of petroleum ether fraction of *Bupleuri Radix*

代谢物	KEGG	HMDB	t_R /min	m/z	离子	模型 vs 对照	C7 vs 模型	C6 vs 模型	C4 vs 模型	代谢通路
<i>L</i> - α -氨基丁酸	C02356	HMDB0000452	1.37	104.071 2	[M+H] ⁺	↓*	↑	↑*	↑	半胱氨酸和蛋氨酸代谢
亮氨酸	C00123	HMDB0000687	3.18	132.102 0	[M+H] ⁺	↓*	↑*	↑*		氨基酸代谢
异亮氨酸	C00407	HMDB0000172	3.44	132.102 0	[M+H] ⁺	↓*	↑*	↑*		氨基酸代谢
羟基异己酸	CE5456	HMDB0000746	6.68	131.070 6	[M-H] ⁻	↓*	↑	↑*	↑	亮氨酸降解
次黄嘌呤	C00262	HMDB0000157	2.39	135.030 4	[M-H] ⁻	↓*	↑	↑*		嘌呤代谢
黄嘌呤	C00385	HMDB0000292	2.88	153.040 8	[M+H] ⁺	↓*	↑	↑*		嘌呤代谢
顺乌头酸	C00417	HMDB0000072	1.63	173.008 6	[M-H] ⁻	↓*	↑	↑*	↑	三羧酸循环

↑-升高 ↓-降低; * $P < 0.05$

↑-up-regulated metabolite ↓-down-regulated metabolite; * $P < 0.05$

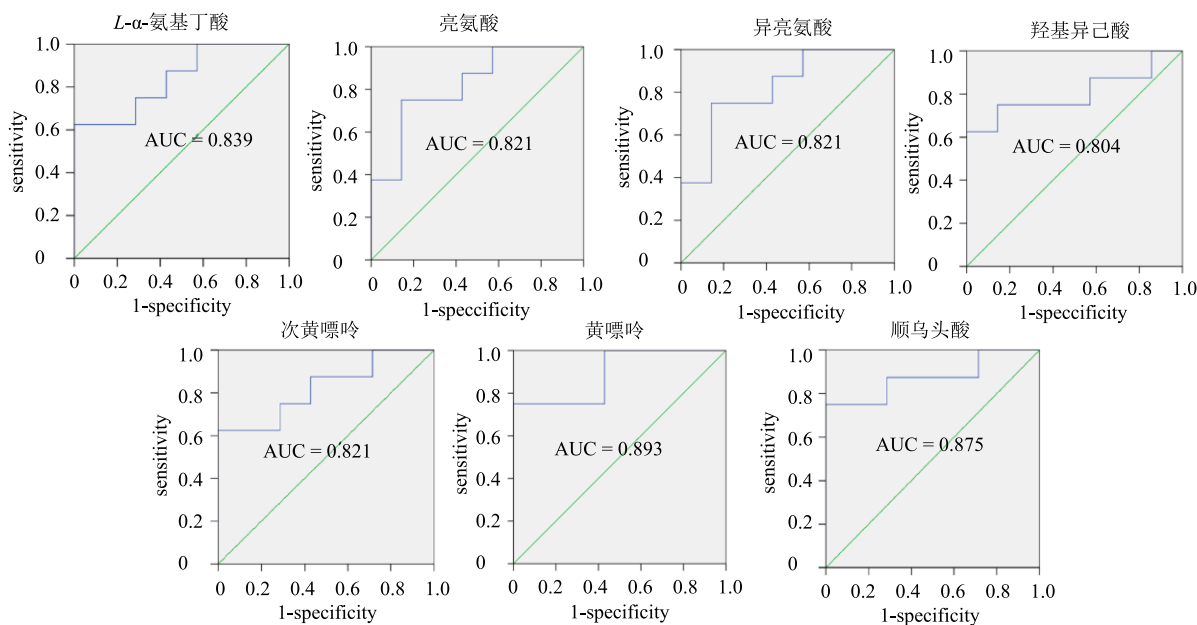
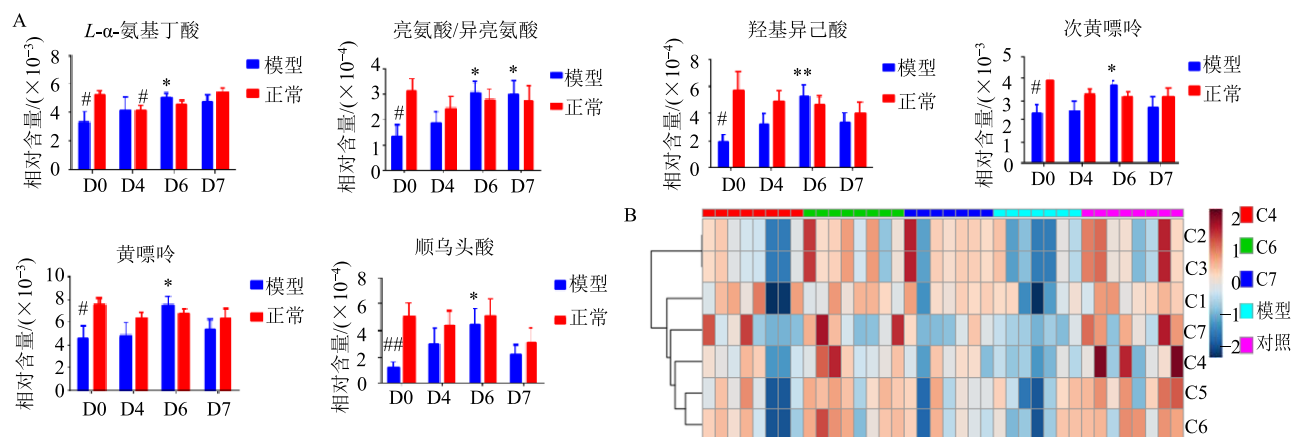


图 3 模型组与对照组大鼠海马差异代谢物的 ROC 曲线分析

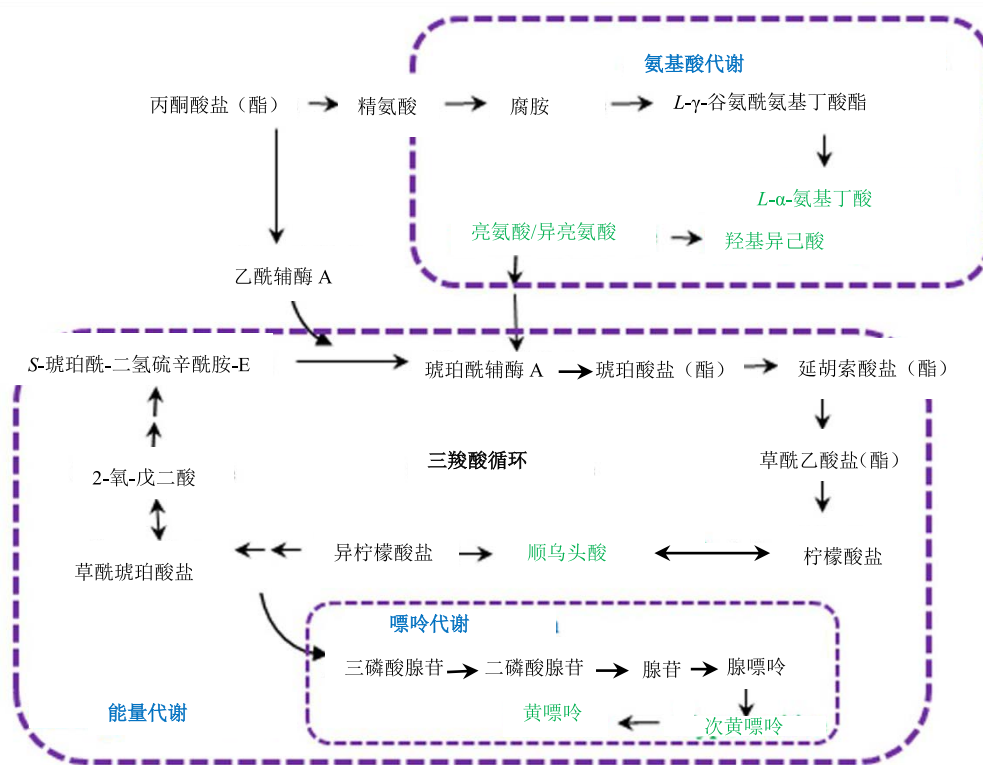
Fig. 3 ROC curves of differential metabolites of hippocampus sample in model group and control group



D0-给予同等剂量空白溶剂 D4-给药质量浓度为 1.25 g·mL⁻¹ D6-给药质量浓度为 5.0 g·mL⁻¹ D7-给药质量浓度为 10.0 g·mL⁻¹; 与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01; 与对照组比较: #*P* < 0.05 ###*P* < 0.01
D0-administration of an equal volume of vehicle D4-the concentration of drug was 1.25 g·mL⁻¹ D6-the concentration of drug was 5.0 g·mL⁻¹ D7-the concentration of drug was 10.0 g·mL⁻¹; **P* < 0.05 ***P* < 0.01 vs model group; #*P* < 0.05 ###*P* < 0.01 vs control group

图 4 大鼠海马组织差异代谢物的相对含量变化 (A, $\bar{x} \pm s, n = 8$) 和含量热点图 (B)

Fig. 4 Levels of differential metabolites in hippocampus samples of rats in each group (A, $\bar{x} \pm s, n = 8$) and heatmap of content (B)



绿色-与对照组比较, 模型组大鼠降低的差异代谢物 蓝色-相关代谢途径
green-down-regulated metabolites in model group vs control group blue-metabolic pathway

图 5 差异代谢物相关代谢通路

Fig. 5 Metabolic pathways of differential metabolites

主要涉及了氨基酸代谢 (amino acid metabolism)、嘌呤代谢 (purine metabolism) 和三羧酸循环 (citrate cycle)。采用 Metabo Analyst 对差异代谢物所涉及代

谢通路进行富集分析, impact value > 0.1 以及 $-\log P > 4$ 的代谢通路被视为贡献最大的代谢途径 (图 6), 主要包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成

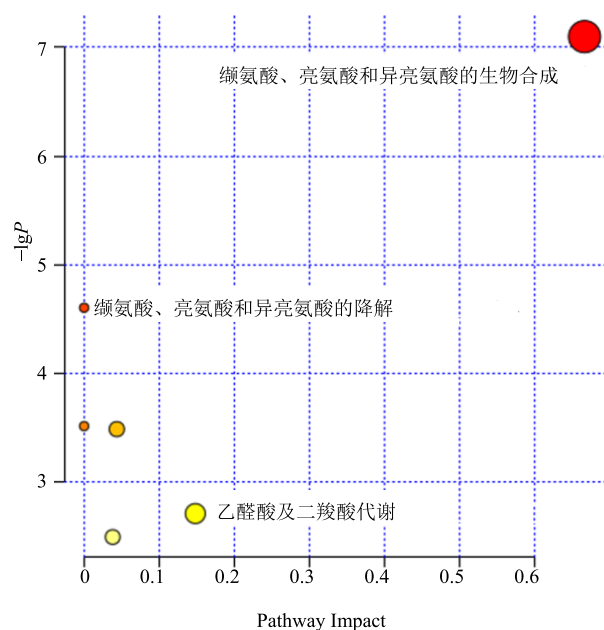


图 6 差异代谢物相关代谢通路富集分析

Fig. 6 Pathways analysis of differential metabolites

(valine, leucine and isoleucine biosynthesis), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (valine, leucine and isoleucine degradation) 和乙醛酸及二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism), 主要涉及氨基酸代谢和三羧酸循环。

3.3 正常大鼠给药组代谢组学研究结果

采用 UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS 方法对对照、Z4、Z6 和 Z7 组大鼠海马组织样品采集代谢轮廓 (图 7), 所得数据进行 PCA。PCA 得分图显示, 正常大鼠给药组 (Z4、Z6 和 Z7) 和对照组聚集在一起, 无明显分离 (图 8), 表明柴胡石油醚部位对正常机体海马组织的代谢轮廓没有产生显著影响。

4 讨论

本研究采用了基于 LC-MS 的代谢组学方法研究了柴胡石油醚部位抗抑郁作用的海马组织代谢轮廓, 明确柴胡石油醚部位抗抑郁症的具体代谢调控通路以及对正常机体是否产生影响。研究结果表明, 柴胡石油醚部位主要通过调节氨基酸代谢、嘌呤代谢和三羧酸循环改善抑郁症状。

氨基酸神经递质系统紊乱在抑郁症发病机制中具有重要作用^[23]。亮氨酸和异亮氨酸是支链氨基酸, 有研究报道, 支链氨基酸通过血脑载体系统传递的过程与 5-羟色胺 (5-HT) 的合成速率有

密切关系^[24-25]。此外, 支链氨基酸尤其是亮氨酸对谷氨酸和谷氨酰胺在星形胶质细胞中的分化功能起着重要作用, 从而维持了脑部氮平衡的稳态, 而其稳态一旦失衡则会影响中枢神经系统的正常功能^[26]。更重要的是, 亮氨酸和异亮氨酸还可以增加海马神经细胞源性神经营养因子 (BDNF) 的表达量, 而 BDNF 主导与抑郁相关的细胞信号转导通路^[27]。羟基异己酸是亮氨酸在组织中的最终代谢产物, 在生命活动中具有重要作用^[28]。由星形胶质细胞调节的谷氨酸能系统参与抑郁症的发病^[29], 而 *L*- α -氨基丁酸可转化产生 γ -氨基丁酸 (GABA), 是半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism) 中间体。当人体内 γ -氨基丁酸水平较低时, 会产生抑郁和焦虑等症状^[30-32]。在本实验中, 与对照组比较, 氨基酸水平在模型组中显著降低, 与文献报道一致^[23], 经过柴胡石油醚部位给药后均可显著回调, 并趋于对照组水平, 表明柴胡石油醚部位通过调节氨基酸神经递质系统代谢产生抗抑郁作用。

黄嘌呤是由次黄嘌呤转化产生, 二者均是腺苷的中间代谢产物, 而腺苷在 ATP 与 ADP 转换过程中发挥重要作用^[11]。在本实验中, 黄嘌呤和次黄嘌呤在模型组大鼠海马组织中的水平降低, 表明抑郁疾病能使腺苷代谢减弱, 进而使抑郁患者机体的能量产生转化途径功能降低。同样, 顺乌头酸是三羧酸循环的中间体, 其水平在模型组大鼠海马组织中降低, 也表明抑郁症使抑郁患者机体三羧酸循环能量代谢水平降低。经柴胡石油醚部位给药后, 抑郁模型大鼠海马组织中低水平的次黄嘌呤、黄嘌呤和顺乌头酸均可出现显著回调并趋于对照组水平的趋势, 表明柴胡石油醚部位除了通过调节氨基酸代谢之外, 还通过调节能量代谢改善抑郁状态。

正常大鼠给药组海马组织代谢轮廓的研究表明, 柴胡石油醚部位对正常机体海马组织代谢轮廓未产生不良影响, 表明其对正常机体海马组织不具有毒性反应。

本课题采用 UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS 技术研究柴胡石油醚部位抗抑郁作用的海马组织代谢调控通路。结果表明, 柴胡石油醚部位通过调节氨基酸代谢和能量代谢改善抑郁状态, 但对正常大鼠海马组织的代谢轮廓并未产生显著影响。该研究结

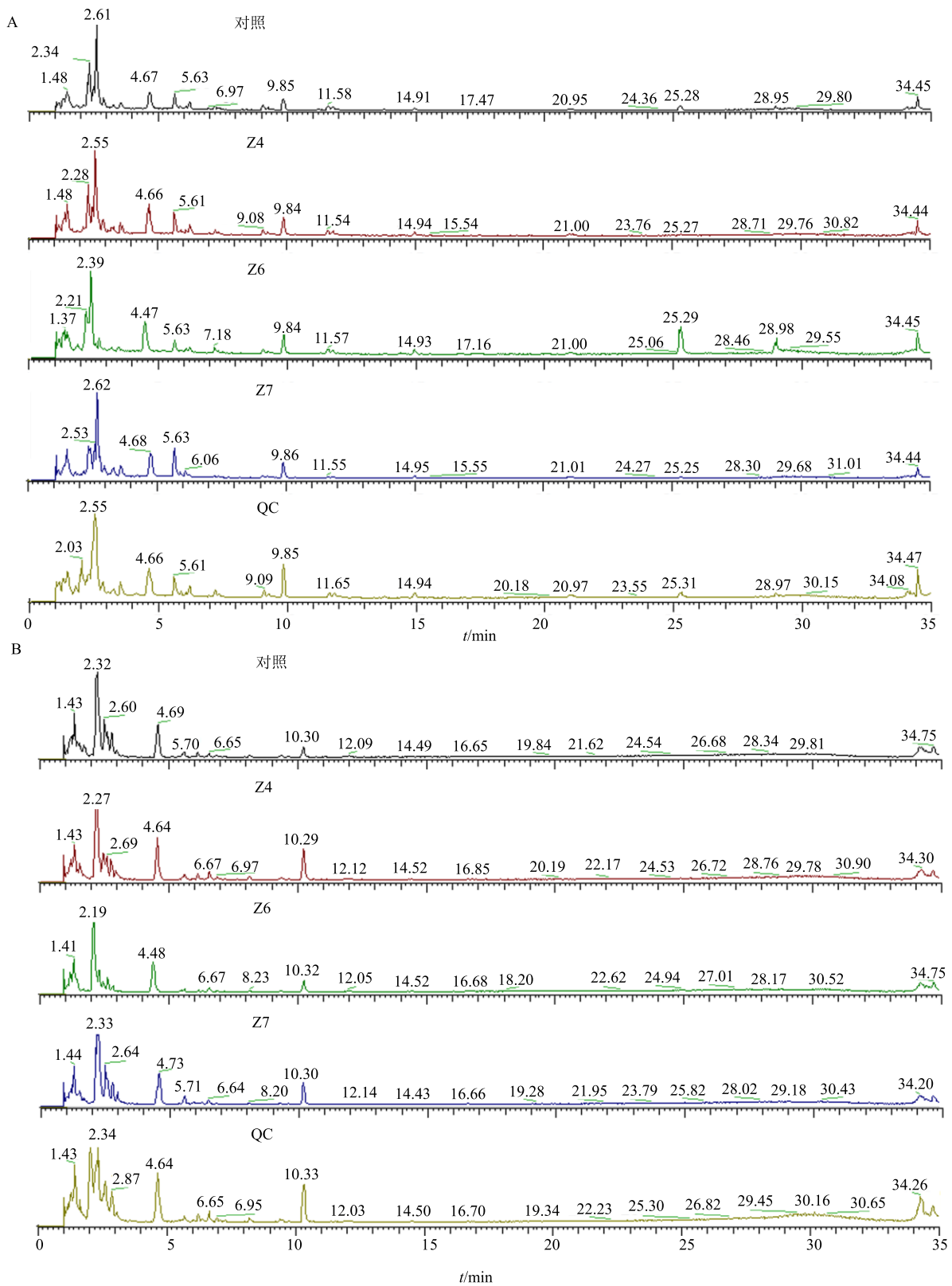


图 7 正常大鼠给药后海马组织 UPLC-MS 正 (A)、负 (B) 离子模式总离子流图

Fig. 7 UPLC-MS total ion chromatograms of hippocampus samples of healthy rats with drug treatment in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

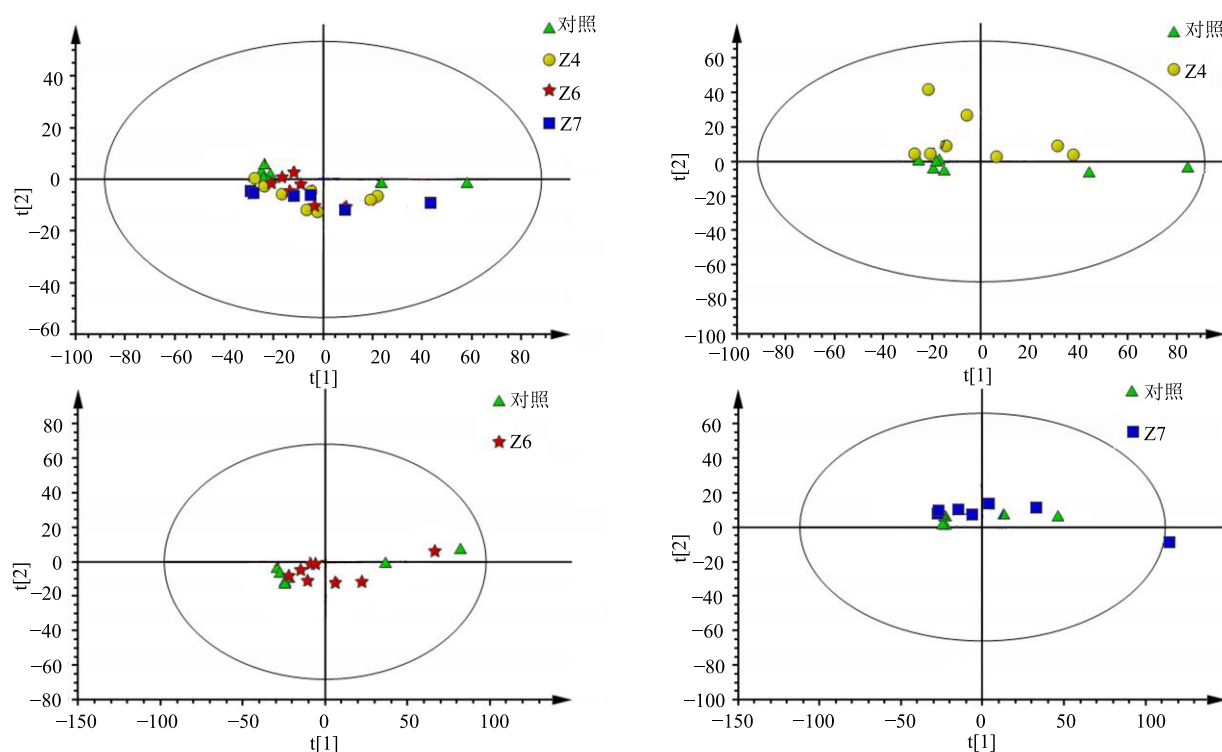


图 8 正常大鼠给药后海马组织差异代谢轮廓的 PCA 图

Fig. 8 Results of multiple pattern recognition of hippocampus metabolic profile in healthy rats with drug treatment

果为柴胡石油醚部位抗抑郁作用潜在分子机制的研究提供了借鉴。

参考文献

- [1] Paykel E S. Depression: Major problem for public health [J]. *Epidemiol Psychiatr Soc*, 2006, 15(1): 4-10.
- [2] Mathers C D, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med*, 2006, doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
- [3] Sarko J. Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2000, 18(4): 637-654.
- [4] Zhou Y, Lu L, Li Z, *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.
- [5] 刘佳丽, 杨 岚, 崔 杰, 等. 基于 UPLC-PDA 法逍遥散乙醇提取物的石油醚萃取物血清药物化学初探 [J]. *中草药*, 2013, 44(20): 2816-2822.
- [6] 秦雪梅, 张丽增, 郭小青. 柴胡及药材习用名考订 [J]. *中药材*, 2007, 30(1): 105-107.
- [7] 于俊林. 柴胡药用部位的研究进展 [J]. *中药材*, 1999, 22(6): 315-317.
- [8] Cheng X Q, Song L J, Li H, *et al*. Beneficial effect of the polysaccharides from *Bupleurum smithii* var. *parvifolium* on "two-hit" acute lung injury in rats [J]. *Inflammation*, 2012, 35(5): 1715-1722.
- [9] Tzeng T F, Lu H J, Liou S S, *et al*. Vinegar-baked *Radix Bupleuri* regulates lipid disorders via a pathway dependent on peroxisome-proliferator-activated receptor- α in high-fat-diet-induced obese rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi:10.1155/2012/827278.
- [10] Lu C N, Yuan Z G, Zhang X L, *et al*. Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(1): 121-126.
- [11] Su Z H, Jia H M, Zhang H W, *et al*. Hippocampus and serum metabolomic studies to explore the regulation of Chaihu-Shu-Gan-San on metabolic network disturbances of rats exposed to chronic variable stress [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(3): 549-561.
- [12] Lei T, Chen S, Wang K, *et al*. Characterization and discrimination of raw and vinegar-baked *Bupleuri Radix* based on UHPLC-Q-TOF-MS coupled with multivariate statistical analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, doi: 10.1002/bmc.4044.
- [13] Yuan B, Yang R, Ma Y, *et al*. A systematic review of the

- active saikosaponins and extracts isolated from *Radix Bupleuri* and their applications [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 620-635.
- [14] Liu J, Fang Y, Yang L, *et al.* A qualitative, and quantitative determination and pharmacokinetic study of four polyacetylenes from *Radix Bupleuri* by UPLC-PDA-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.002.
- [15] 张 峰, 方 媛, 周玉枝, 等. UPLC-PDA 同时测定柴胡中 8 种多炔类化合物的含量 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1704-1710.
- [16] Gao X, Liang M, Fang Y, *et al.* Deciphering the differential effective and toxic responses of *Bupleuri Radix* following the induction of chronic unpredictable mild stress and in healthy rats based on serum metabolic profiles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2017.00995.
- [17] 王敏建, 况 利. 脑海马结构与抑郁障碍的关系 [J]. 中国临床康复, 2005(48): 116-118.
- [18] Medina S, Dominguez-Perles R, Gil J I, *et al.* Metabolomics and the diagnosis of human diseases-a guide to the markers and pathophysiological pathways affected [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(7): 823-848.
- [19] Lu A P, Bian Z X, Chen K J. Bridging the traditional chinese medicine pattern classification and biomedical disease diagnosis with systems biology [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(12): 883-890.
- [20] Theodoridis G A, Gika H G, Want E J, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2011.09.042.
- [21] Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling [J]. *J Chromatogr A*, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.017.
- [22] Tian J S, Shi B Y, Xiang H, *et al.* ¹H-NMR-based metabonomic studies on the anti-depressant effect of genipin in the chronic unpredictable mild stress rat model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75721.
- [23] Yang P, Li X, Ni J, *et al.* Alterations of amino acid level in depressed rat brain [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(5): 371-376.
- [24] Ni Y, Su M, Lin J, *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2627-2636.
- [25] 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 ¹H NMR-based metabolomics approach [J]. *J Affect Disord*, 2015, doi: 10.1016/j.jad.2015.05.005.
- [26] Shimomura Y, Harris R A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: Discussion of session 1 [J]. *J Nutr*, 2006, 136(Suppl 1): 232s-233s.
- [27] Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Ikeda T, *et al.* The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 220(2): 271-280.
- [28] Lang C H, Pruznak A, Navaratnarajah M, *et al.* Chronic alpha-hydroxyisocaproic acid treatment improves muscle recovery after immobilization-induced atrophy [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(3): 416-428.
- [29] Wang Q, Jie W, Liu J H, *et al.* An astroglial basis of major depressive disorder? An overview [J]. *Glia*, 2017, 65(8): 1227-1250.
- [30] Jr Brady R O, McCarthy J M, Prescott A P, *et al.* Brain gamma-aminobutyric acid (GABA) abnormalities in bipolar disorder [J]. *Bipolar Disord*, 2013, 15(4): 434-439.
- [31] Rosso I M, Weiner M R, Crowley D J, *et al.* Insula and anterior cingulate GABA levels in posttraumatic stress disorder: Preliminary findings using magnetic resonance spectroscopy [J]. *Depress Anxiety*, 2014, 31(2): 115-123.
- [32] 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, 41(3): 37-45.