

运用核磁代谢组学技术探讨天丝饮对慢性应激大鼠血清代谢的影响及机制

马素亚¹, 畅洪昇², 程 丹¹, 李红梅³, 李玲玲¹, 李鑫洁¹, 鲁 艺^{1*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

3. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: **目的** 探究天丝饮对慢性应激大鼠血清代谢组学的影响及作用机制。**方法** 采用去势后慢性应激制备大鼠模型, ig 天丝饮 3.5 g/kg, 给药 6 周后进行水迷宫实验和核磁代谢组学检测。**结果** 水迷宫实验结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠潜伏距离延长 ($P < 0.01$), 穿越平台次数减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组大鼠逃避潜伏距离缩短 ($P < 0.01$), 穿越平台次数增加。核磁代谢组学结果显示模型组与对照组比较, 代谢物丙氨酸、脲基乙内酰胺、精氨酸、肌酸、丙酮酸、丝氨酸含量增加, 天冬酰胺酸、肉碱、甘油、*N,N*-二甲基甘氨酸、*N*-乙酰谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸含量减少; 葡萄糖、谷氨酰胺、甲基组氨酸含量在不同化学位移表现出不同的变化趋势。天丝饮组大鼠与模型组比较, 代谢物精氨酸与丙氨酸均减少; 天丝饮组大鼠与对照组比较, 代谢物缬氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、乙酰乙酸、天冬酰胺酸、赖氨酸、甘油、肉碱、2-氨基-3-羟基丁酸均减少, 代谢物脲基乙内酰胺增多。**结论** 天丝饮对慢性应激大鼠血清代谢组学作用机制主要表现在调节氨基酸代谢。

关键词: 天丝饮; 慢性应激; 核磁代谢组学; 氨基酸代谢; 水迷宫实验

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5358-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.021

Serum metabolomics reasearch of Tiansi Liquid on chronic stress rats utilizing NMR metabolomics

MA Su-ya¹, CHANG Hong-sheng², CHENG Dan¹, LI Hong-mei³, LI Ling-ling¹, LI Xin-jie¹, LU Yi¹

1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To explore the serum metabolomics mechanism of Tiansi Liquid on chronic stress rats. **Methods** The chronic unpredictable mild stress model with ovariectomization was utilized by giving Tiansi Liquid 3.5 g/kg, detection was carried out by Morris water maze and NMR metabolomics after six weeks of administration. **Results** The Morris water maze result showed that, compared with the control group, the distance to zone platform prolonged ($P < 0.01$) and the times of passing platform decreased ($P < 0.05$) in model group. While, the distance to zone platform shortened ($P < 0.01$) and the times of passing platform increased in treatment group compared with the model group. The NMR metabolomics showed that compared with the control group, the contents of alanine, allantoin, arginine, creatine, pyruvate, and serine were increased in model group, and the contents of asparagine, carnitine, glycerol, *N,N*-dimethylglycine, *N*-acetylglutamine, threonine, and valine were decreased in model group. The contents of glucose, glutamine, and methylhistidine in model group show different trends at different chemical shift. Compared with model group, the content of arginine and alanine were decreased in treatment group. Compared with the control group, the content of valine, arginine, glutamine, acetoacetate, asparagine, lysine, glycerol, carnitine, and threonine were decreased in treatment group, while the content of allantoin was increased in treatment group. **Conclusion** The main metabolomics effect of Tiansi Liquid on chronic stress rats was amino acid metabolism.

Key words: Tiansi Liquid; chronic stress; NMR metabolomics; amino acid metabolism; Morris water maze

天丝饮为巴戟天与菟丝子等比例组方而成, 出自《辨证录》, 具有补肾元、定神志的功效, 主治健忘、惊悸、恐惧等情志病症。方中巴戟天性辛、甘、微温, 无毒。《神农本草经》记载其主治麻风病、阳

收稿日期: 2018-06-08

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (18G40092)

作者简介: 马素亚 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为神经药理学。Tel: 18810252522 E-mail: masuya0217@163.com

*通信作者 鲁 艺, 硕士生导师, 主要从事神经药理学研究。E-mail: luyi@bucm.edu.cn

痿;并能补中益气、强筋骨、安五脏及增志。《名医别录》言其治头面游风、少腹、阴部疼痛,且有补五劳、益精、助阳作用。菟丝子辛甘、平,无毒,《神农本草经》记载其能接筋续伤、补益虚损、增加气力、使人肥健。《名医别录》记载其滋养肌肉、壮阳、强筋健骨,主治阴茎寒冷、滑精、小便后余沥不尽、口苦干燥而渴、血寒瘀积,久服可名目、轻身有力、延年益寿。现代研究表明巴戟天有效成分巴戟天寡糖效应与氟西汀相近,具有抗抑郁作用^[1-2]。菟丝子成分金丝桃苷也有较好的抗抑郁作用^[3]。本课题组前期实验研究表明天丝饮可能通过降低吲哚胺2,3-过氧化酶(IDO)活性和数量,调节色氨酸-犬尿氨酸(TRP-KYN)途径,发挥抗抑郁作用^[4],网络药理学研究显示天丝饮的抗抑郁作用是一种协同的多成分、多靶点作用机制^[5]。天丝饮可能通过抗自由基发挥神经保护作用^[6],细胞学研究表明天丝饮多糖成分(巴戟天多糖提取物、菟丝子多糖提取物)能促进突触后致密物(postsynaptic density protein 95, PSD-95)和磷酸化的细胞外信号调节激酶1/2(extracellular regulated kinase 1/2, ERK1/2)通路蛋白表达发挥抗神经元损伤作用^[7]。

天丝饮作用于机体发挥效果的代谢机制研究目前尚处于空白。中药研究过程中体内药效物质谱与生物转化谱是美国食品药品监督管理局(FDA)审评过程中亟需解决的问题,而核磁代谢组学为解决这一问题的有力技术手段。中医药与代谢组学和系统生物学的结合,是一个极富创造性并引领中医药现代化的重要之举^[8]。代谢组学通过建立整体观来剖析生命现象,采用核磁共振谱和质谱等现代仪器分析手段,定性定量检测生物体液(包括尿液、血浆或血清、唾液、脑脊液、精液、汗液等)中尽可能多的内外源性代谢物^[9],为医药领域多方向提供交叉借鉴的机会。本研究在以往研究的基础上运用核磁代谢组学探究天丝饮对慢性应激大鼠血清代谢组学的影响及作用机制,为天丝饮药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠42只,SPF级,56~62 d,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品与试剂

盐菟丝子颗粒(批号13006761,1 g相当于饮片10 g)、巴戟天颗粒(批号13000111,1 g相当于

饮片5 g)购自北京康仁堂药业有限公司;重水(美国Norell公司)。

1.3 仪器

101FAB-2型电热鼓风干燥箱(上海树立仪器有限公司);Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所);CNU VNMRs 600 MHz超导傅里叶变换核磁共振波谱仪(美国Varian公司),场强为14.1 T(600 MHz)的超导磁体,配备1H/13C/31P/19F四核探头、梯度反相探头(109Ag-31P)、固体高分辨魔角旋转探头;Sigma1-15PK小型高速冷冻离心机(德国Sigma公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

采用随机数字法将大鼠分为对照组、模型组、天丝饮组,每组7只。大鼠适应性饲养1周后,10%水合氯醛3 mg/kg麻醉,摘除模型组和天丝饮组大鼠双侧卵巢,去势后休养7 d开始造模和给药。造模采用夹尾、昼夜颠倒、束缚、冷刺激、热刺激、禁水24 h、禁食24 h 7种方法随机刺激模型组及天丝饮组。造模同时开始ig给药,共给药6周。天丝饮配方为盐菟丝子颗粒-巴戟天颗粒(1:2),给药质量浓度为0.35 g/mL,给药剂量为3.5 g/kg,药效学所用剂量为成人口服剂量的7倍。

2.2 Morris水迷宫实验

给药结束后,预实验1 d,定位航行实验4 d,空间探索实验1 d,平台位于西南象限。定位航行实验中东南、东北、西北3个象限为入水点。记录搜索平台距离即逃避潜伏期距离,如大鼠在60 s内未找到平台,则由实验者将其引向平台,其潜伏期记录为60 s。空间探索实验在第5天撤平台,入水点为平台对侧,记录穿越原平台次数。

2.3 核磁代谢组学检测

血清样品处理:大鼠麻醉后腹主动脉取血,取血后采血管常温静置2 h,4 ℃、13 000 r/min离心5 min,取上清放置于-80 ℃冰箱待测。检测时-80 ℃冰箱取出待测血清样品,遵循速冻慢融原则。血清样品取出后取上清200 μL加入400 μL重水,4 ℃、13 000 r/min离心10 min,取上清550 μL置于核磁管待检。

血清样品采用超导傅里叶变化核磁共振波谱仪进行检测。实验参数设置为8 000 Hz,采样点数为32 k,采样时间为2 s,累加次数为64次,预饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减信号

经过 32 k 傅里叶变换转为二维 NMR 图谱。

2.4 数据统计分析

Morris 水迷宫实验结果采用 SPSS 20 软件进行统计学处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分别进行单因素方差分析, 继以 LSD 进行多重比较。

核磁代谢组学实验数据预处理: 使用 MestReNova 对谱图进行处理。预处理数据导出至 SIMCA 13.0 进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。使用差异性变量的重要性投影值 (VIP)

值方法确定标志性的代谢物。使用 Chenomx Nmr Suite 确定代谢物, MetaboAnalyst 进行代谢通路分析。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫实验结果

定位航行结果显示, 实验第 4 天, 与对照组比较, 模型组大鼠潜伏距离延长 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 天丝饮组大鼠逃避潜伏距离缩短 ($P < 0.01$); 空间探索实验结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠穿越平台次数减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 天丝饮组大鼠穿越平台次数增加, 见表 1。

表 1 各组大鼠学习记忆行为 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Learning and memory behavior of all groups ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	逃避潜伏距离/cm				穿越平台次数
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	
对照	13 301.9 $\pm$ 6 442.7	4 134.4 $\pm$ 2 072.1	1 969.9 $\pm$ 1 024.5	1 035.0 $\pm$ 576.7	8.7 $\pm$ 1.0
模型	11 418.9 $\pm$ 5 481.9	4 397.7 $\pm$ 1 871.3	2 773.7 $\pm$ 2 057.6	1 860.1 $\pm$ 1 177.0**	6.5 $\pm$ 1.6*
天丝饮	8 963.9 $\pm$ 5 532.2	3 293.3 $\pm$ 1 813.4	1 505.5 $\pm$ 984.0	1 014.5 $\pm$ 554.3##	8.1 $\pm$ 2.1

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

3.2 核磁代谢组学分析

由于生物样品中同时含有大分子及小分子代谢物, 代谢物信号在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中相互遮挡, 影响定性与定量分析。本研究使用谱编辑技术解决这一问题, 利用弛豫编辑 (carr-purcell-meiboom-gill, CPMG) 脉冲序列, 消除大分子化合物信号, 仅获得小分子信号; 采用扩散编辑 (diffusion editing, LED) 的方法消除小分子谱峰, 获得大分子的谱峰^[10]。

3.2.1 CPMG 实验

(1) PCA-X: PCA 是在保留原始变量主要信息的前提下, 通过降维技术把多个具有一定相关性的指标约化为少数几个综合指标的多元统计分析方法, 且随着主成分的增加, 其所包含的信息量越来越少。PCA 得分散点图能直观地显示不同样品之间的整体差异, 且在得分图中, 投影在某主成分上的绝对值越大, 表明该主成分对该类的区分影响越大^[11]。

结果显示 (图 1), 对照组、模型组、天丝饮组组间重合, 区分不明显。表明各组小分子代谢物类似。

(2) PLS-DA: PCA 是一种无监督的分析方法, 只反映数据的原始状态, 不能忽略组内误差, 消除与研究目的无关的随机误差, 忽略了数据的整体特征与变化规律, 不利于寻找组间差异和差异代谢物。PLS-DA 分析着重强调组间的差异, 而将组内的差

异降至最低, 更能把握多维数据的整体特征和变异规律^[11]。

结果显示 (图 2), 对照组、模型组、天丝饮组组间明显重合, 组间差异不明显。表明各组小分子代谢物类似。

(3) OPLS-DA: OPLS-DA 是 PLS-DA 的一种衍生运算分析方法, 主要结合了正交矫正信号 (OSC) 和 PLS 2 种方法, 通过将 X 轴矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的 2 类信息, 能够排除与分组不相关的一些变量, 更准确地筛选出有价值的差异性变量, 从而使判别能力更优。OPLS-DA 过滤掉不相关的正交信号, 结合 VIP 值, 可使获得的差异性代谢物更加可靠^[12]。

结果显示 (图 3), 对照组、模型组、天丝饮组组间重合, 差异不明显, 表明各组小分子代谢物类似。

3.2.2 LED 实验

(1) PCA-X: 结果显示 (图 4), 模型组与对照组比较, 有重合的部分也有差异的部分, 大分子代谢物有部分差异; 天丝饮组与模型组比较差异较明显, 大分子代谢物有差异; 天丝饮组与对照组比较, 既有重合的部分也有少数不重合的部分, 大分子代谢物不完全相同。

(2) PLS-DA: 结果显示 (图 5), 模型组与对照组比较, 不重合的部分较多, 大分子代谢物有差异;

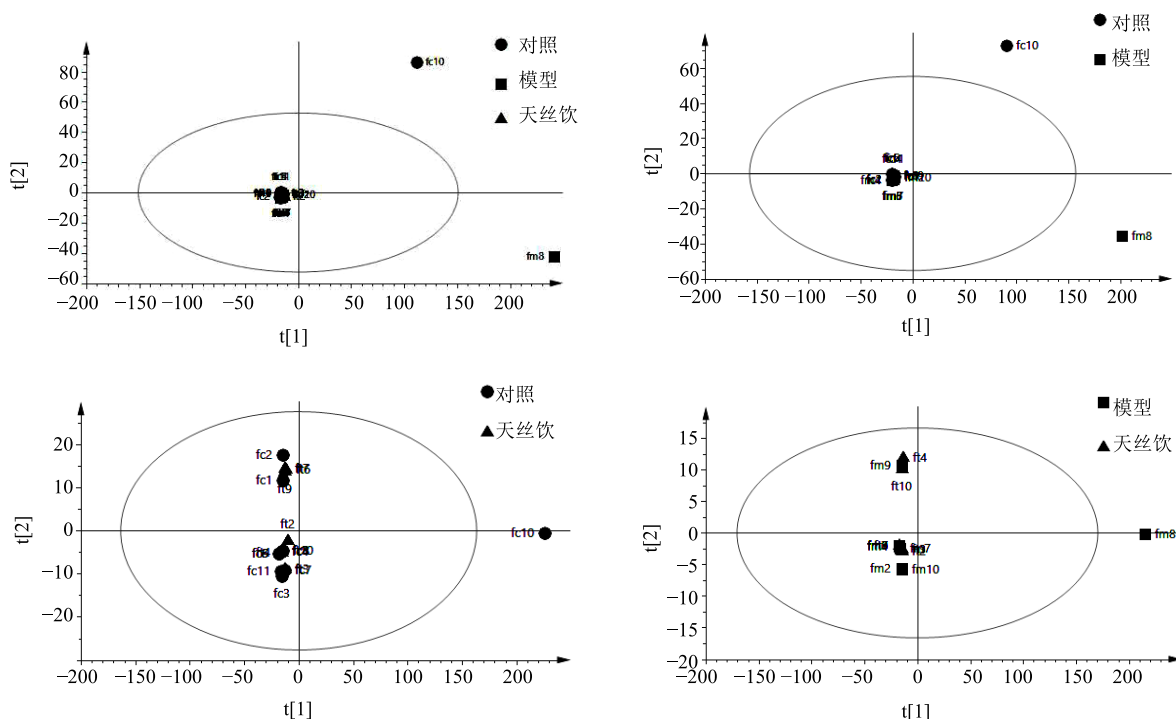


图 1 CPMG 实验中各组代谢物 PCA-X 结果

Fig. 1 PCA-X results of metabolites of each group in CPMG experiment

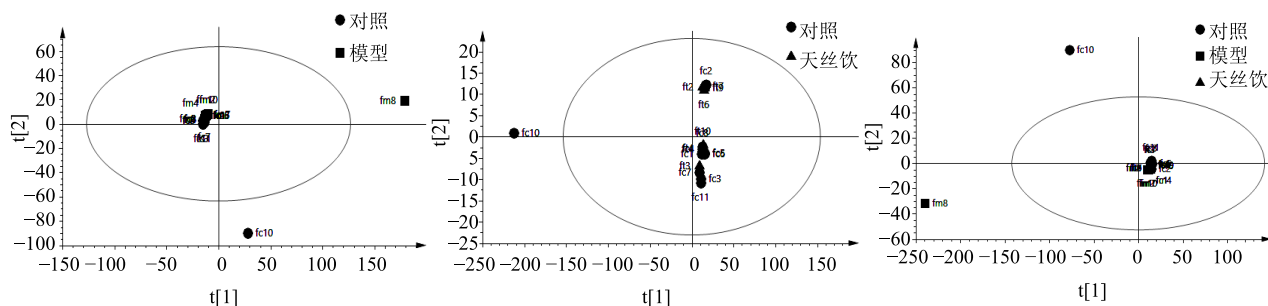


图 2 CPMG 实验中各组代谢物 PLS-DA 结果

Fig. 2 PLS-DA results of metabolites of each group in CPMG experiment

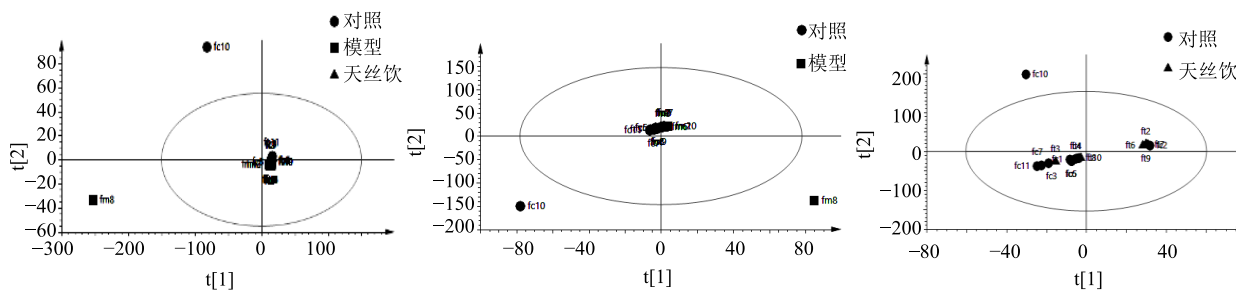


图 3 CPMG 实验中各组代谢物 OPLS-DA 结果

Fig. 3 OPLS-DA results of metabolites of each group in CPMG experiment

天丝饮组与模型组比较差异较明显,大分子代谢物有差异;天丝饮组与对照组比较,既有重合的部分也有少数不重合的部分,大分子代谢物不完全相同。

(3) OPLS-DA: 结果显示(图 6),模型组与对照组比较,不重合的部分较多,大分子代谢物有差异;天丝饮组与模型组比较差异较明显,大分子代谢

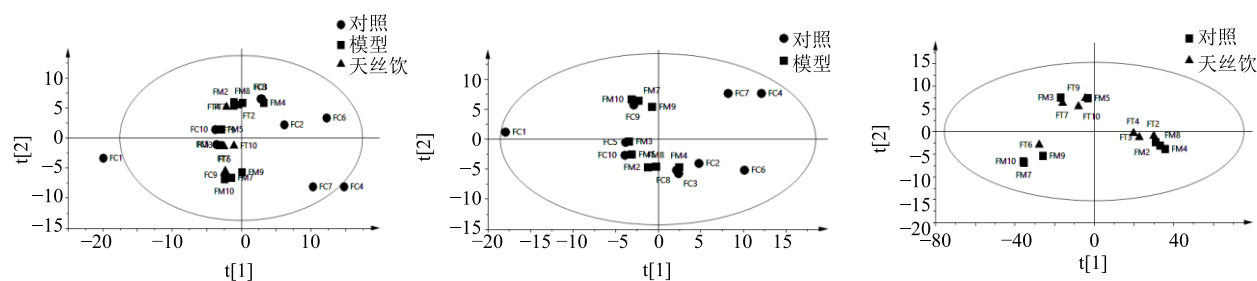


图 4 LED 实验中各组代谢物 PCA-X 结果

Fig. 4 PCA-X results of metabolites of each group in LED experiment

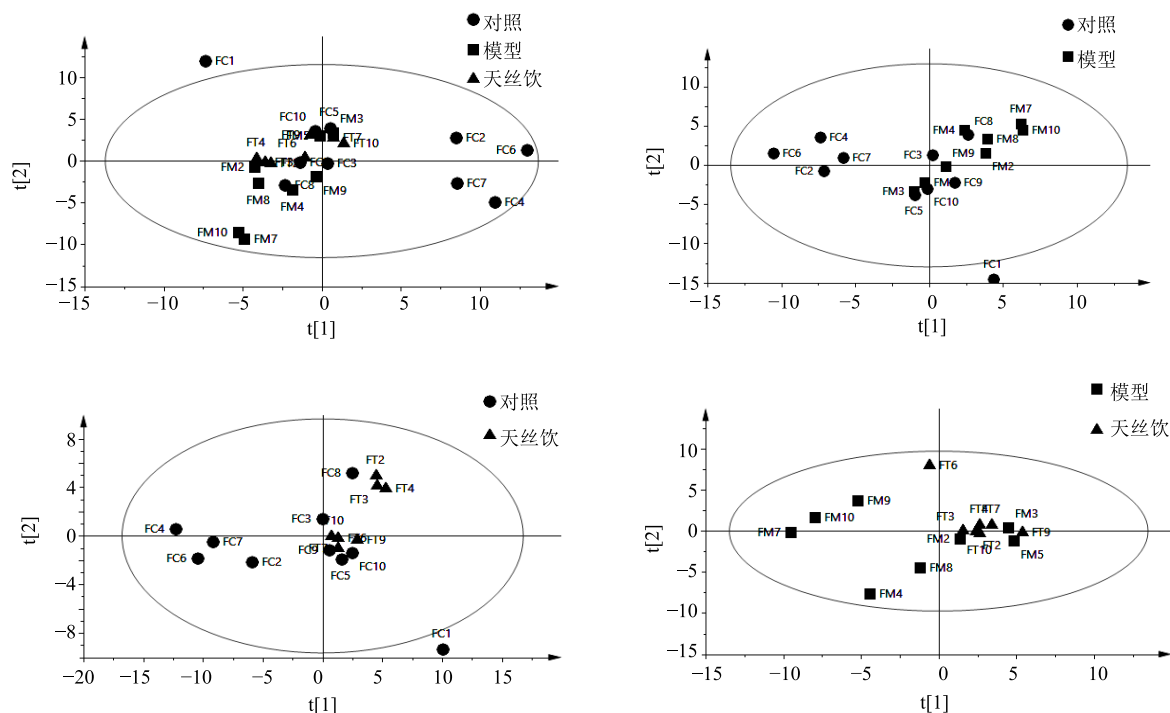


图 5 LED 实验中各组代谢物 PLS-DA 结果

Fig. 5 PLS-DA results of metabolites of each group in LED experiment

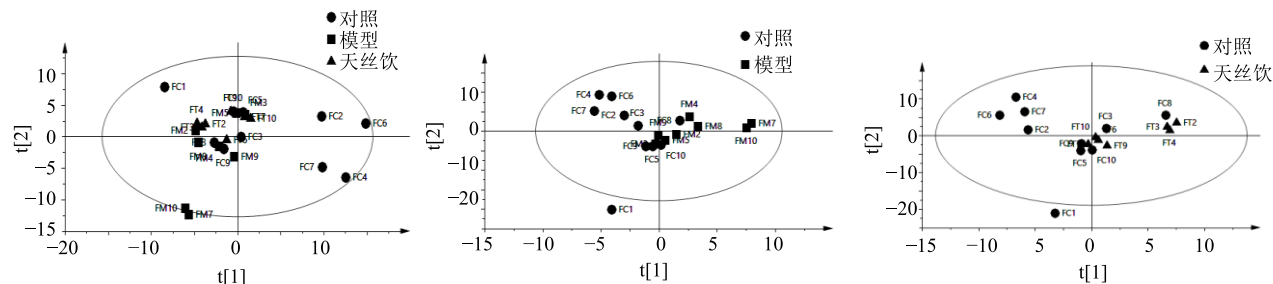


图 6 LED 实验中各组代谢物 OPLS-DA 结果

Fig. 6 OPLS-DA results of metabolites of each group in LED experiment

物有差异；天丝饮组与对照组比较，既有重合的部分也有少数不重合的部分，大分子代谢物不完全相同。

3.2.3 各组差异代谢物及核磁代谢图谱 表 2~4 及图 7 结果显示，模型组与对照组比较，代谢物丙

氨酸、脲基乙内酰胺、精氨酸、肌酸、丙酮酸、丝氨酸含量增加，天冬酰胺酸、肉碱、甘油、*N,N*-二甲基甘氨酸、*N*-乙酰谷氨酰胺、苏氨酸、缬氨酸含量减少。代谢物葡萄糖、谷氨酰胺、甲基组氨酸含

表 2 模型组与对照组差异代谢物

Table 2 Differential metabolites between model group and control group

代谢物	化学位移 (δ)	Sig. (双侧)	VIP [2]	比值 (模型组: 对照组)	lg 比值
丙氨酸	1.47 ↑*, 3.80 ↑	0.004	2.18	1.783	0.251
脲基乙内酰胺	5.39 ↑*	0.018	1.72	2.314	0.364
精氨酸	1.68 ↑*	0.033	1.59	1.306	0.116
天冬酰胺酸	2.84 ↓, 2.92 ↓, 2.95 ↓*	0.004	2.09	0.048	-1.317
肉碱	3.22 ↓*	0.029	1.70	0.905	-0.043
肌酸	3.93 ↑, 3.94 ↑*	0.011	1.81	1.184	0.073
葡萄糖	3.23 ↑, 3.38 ↑*, 3.40 ↓, 3.75 ↓, 3.70 ↓	0.008	2.11	2.760	0.440
谷氨酰胺	2.10 ↑, 2.43 ↑*, 2.46 ↓, 2.50 ↓	0.002	2.24	1.771	0.248
甘油	3.67 ↓*	0.002	2.23	0.816	-0.088
赖氨酸	1.90 ↓, 1.91 ↓*, 3.02 ↓, 3.03 ↓	0.002	2.08	0.634	-0.198
甲基组氨酸	7.05 ↓, 7.74 ↑, 7.75 ↓*	0.000	2.27	0.371	-0.431
<i>N,N</i> -二甲基甘氨酸	2.93 ↓*	0.019	1.70	0.714	-0.146
<i>N</i> -乙酰谷氨酰胺	2.04 ↓*	0.046	1.49	0.905	-0.043
丙酮酸	2.38 ↑*	0.012	1.94	1.411	0.149
丝氨酸	3.96 ↑*	0.020	1.92	1.230	0.090
苏氨酸	1.32 ↓, 3.61 ↓, 4.24 ↓, 4.25 ↓*	0.003	2.05	0.604	-0.219
缬氨酸	0.98 ↓, 0.99 ↓*	0.007	1.90	0.857	-0.067

↑-增加 ↓-减少 **P* 值最显著或比值最大的化学位移值, 下同

↑-increase ↓-reduce *chemical shift of top-significant value or top-ratio value, same as below

表 3 天丝饮组与模型组差异代谢物

Table 3 Differential metabolites between treatment group and model group

代谢物	化学位移 (δ)	Sig. (双侧)	VIP [2]	比值 (天丝饮组: 模型组)	lg 比值
精氨酸	1.68 ↓*, 1.73 ↓	0.034	1.94	0.727	-0.138
未知化合物	2.90 ↓*	0.031	1.74	0.016	-1.800
丙氨酸	3.79 ↓, 3.80 ↓*	0.003	2.22	0.813	-0.090
未知化合物	4.19 ↑*	0.028	1.76	1.516	0.181
未知化合物	5.37 ↑*	0.039	1.71	1.633	0.213
未知化合物	6.00 ↓*	0.043	1.64	0.088	-1.056
未知化合物	6.11 ↓*	0.045	1.70	0.250	-0.602
未知化合物	6.46 ↓*	0.009	2.07	0.269	-0.571
未知化合物	6.90 ↓*	0.044	1.99	0.780	-0.108
未知化合物	7.21 ↓*	0.040	1.71	0.172	-0.765
未知化合物	7.56 ↓*	0.046	1.66	0.184	-0.736
未知化合物	7.97 ↓*	0.014	2.01	0.023	-1.631
未知化合物	8.19 ↑*	0.049	1.91	8.103	0.909
未知化合物	8.76 ↓*	0.025	1.79	0.088	-1.057
未知化合物	8.81 ↓*	0.033	1.73	0.162	-0.790

表 4 天丝饮组与对照组差异代谢物

Table 4 Differential metabolites between treatment group and control group

代谢物	化学位移 (δ)	Sig. (双侧)	VIP [2]	比值 (天丝饮组: 对照组)	lg 比值
缬氨酸	0.97 ↓, 0.98 ↓, 0.99 ↓*, 1.00 ↓	0.008	1.59	0.789	-0.103
精氨酸	1.69 ↓*, 1.71 ↓	0.038	1.48	0.759	-0.120
赖氨酸	1.89 ↓, 1.90 ↓*, 1.91 ↓	0.003	1.85	0.592	-0.227
乙酰乙酸	2.29 ↓*	0.028	1.67	0.814	-0.089
谷氨酰胺	2.46 ↓*, 2.15 ↓	0.010	1.56	0.812	-0.090
天冬酰胺酸	2.92 ↓*, 2.95 ↓	0.007	1.56	0.577	-0.238
赖氨酸	3.02 ↓*, 3.03 ↓	0.021	1.38	0.695	-0.158
肉碱	3.22 ↓*	0.004	1.85	0.845	-0.073
甘油	3.67 ↓*	0.013	1.74	0.834	-0.079
2-氨基-3-羟基丁酸	4.25 ↓*	0.014	1.52	0.742	-0.130
脲基乙内酰胺	5.39 ↑*	0.001	1.88	2.951	0.470

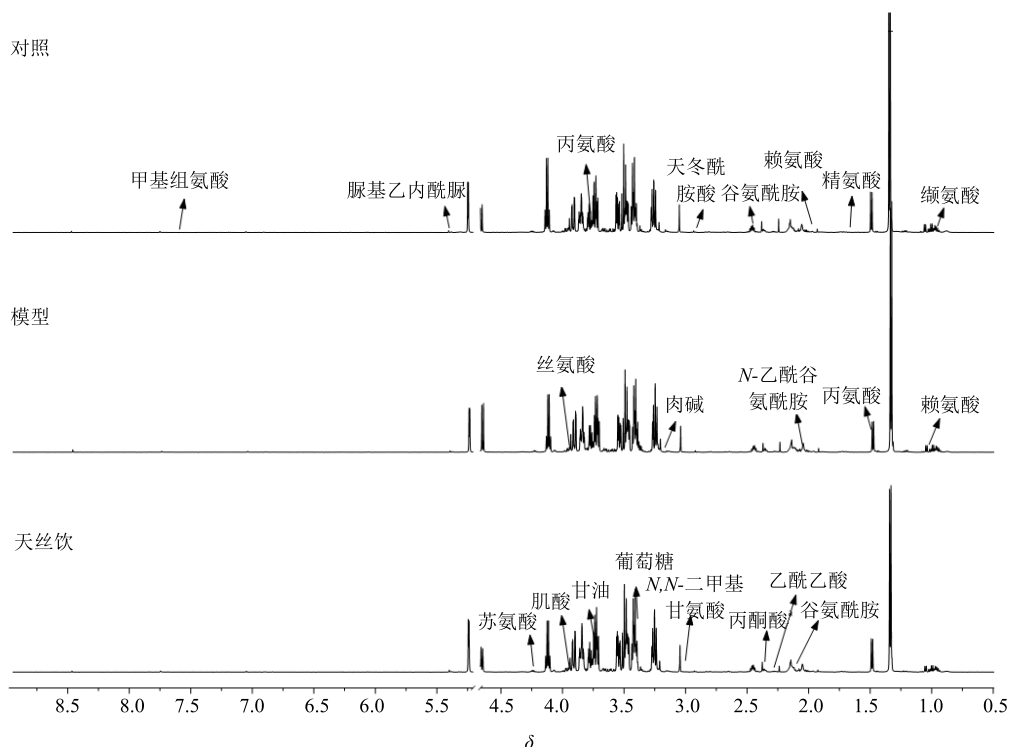


图 7 各组核磁代谢图谱

Fig. 7 NMR metabolomic spectra of each group

量模型组较对照组在不同化学位移表现不同的变化趋势，其趋势的增减程度都有统计学差异。

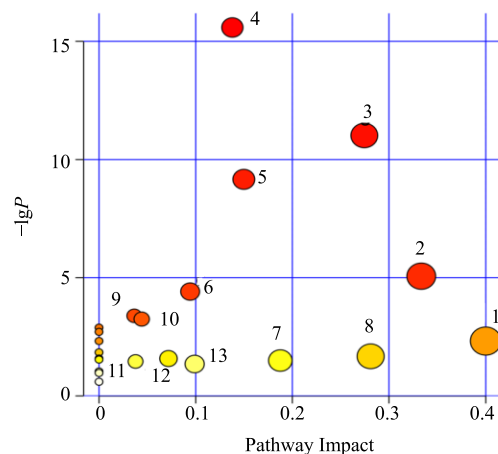
天丝饮组与模型组比较，代谢物精氨酸与丙氨酸均减少。另有其他代谢产物的差异，鉴于代谢库未查到，未列出。

天丝饮组与对照组比较，代谢物缬氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、乙酰乙酸、天冬酰胺、赖氨酸、甘油、肉碱、2-氨基-3-羟基丁酸均减少，脲基乙内酰胺增多。

3.2.4 核磁代谢通路分析

(1) 对照组-模型组: MetaboAnalyst 代谢通路分析结果(图 8)显示，慢性应激造模后，与对照组比较，模型组发生紊乱的主要代谢通路有 7 个(影响值大于 0.1 的代谢路径)，分别为氨基酰基-tRNA 生物合成，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸，缬草碱、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成，甲烷代谢和甘油酯代谢，丙酮酸代谢。

(2) 对照组-天丝饮组: 结果显示(图 9)，给予天丝饮后，与对照组比较，天丝饮组作用机制相关的代谢通路主要有 4 个(影响值大于 0.1 的代谢路径)，分别为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，酮体的合成与降解，缬草碱、亮氨酸和异亮氨酸的生

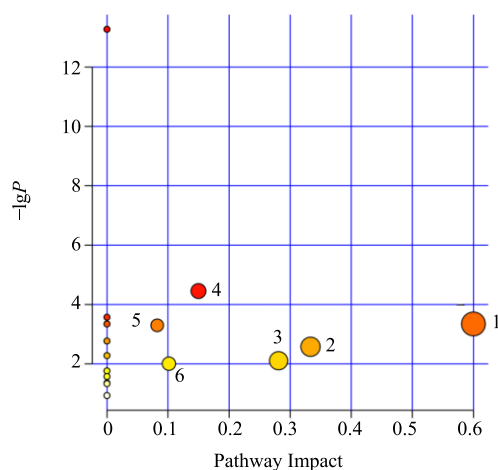


1-甲烷代谢 2-缬草碱、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 3-甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 4-氨基酰基-tRNA 生物合成 5-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸 6-精氨酸与脯氨酸代谢 7-丙酮酸代谢 8-甘油酯代谢 9-半乳糖代谢 10-半胱氨酸与蛋氨酸代谢 11-淀粉和蔗糖代谢 12-柠檬酸循环

1-methane metabolism 2-valine, leucine, and isoleucine biosynthesis 3-glycine, serine, and threonine metabolism 4-aminoacyl-tRNA biosynthesis 5-alanine, aspartate, and glutamate 6-arginine and proline metabolism 7-pyruvate metabolism 8-glycerolipid metabolism 9-galactose metabolism 10-cysteine and methionine metabolism 11-starch and sucrose metabolism 12-citrate cycle

图 8 对照组与模型组代谢通路分析

Fig. 8 Metabolism pathway between control and model groups



1-酮体的合成与降解 2-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成
3-甘油酯代谢 4-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 5-精氨酸与脯氨酸代谢 6-丁酸代谢

1-synthesis and degradation of ketone bodies 2-valine, leucine and isoleucine biosynthesis 3-glycerolipid metabolism 4-alanine, aspartate and glutamate metabolism 5-arginine and proline metabolism 6-butanolate metabolism

图 9 对照组与天丝饮组代谢通路分析

Fig. 9 Metabolism pathway between control group and model group

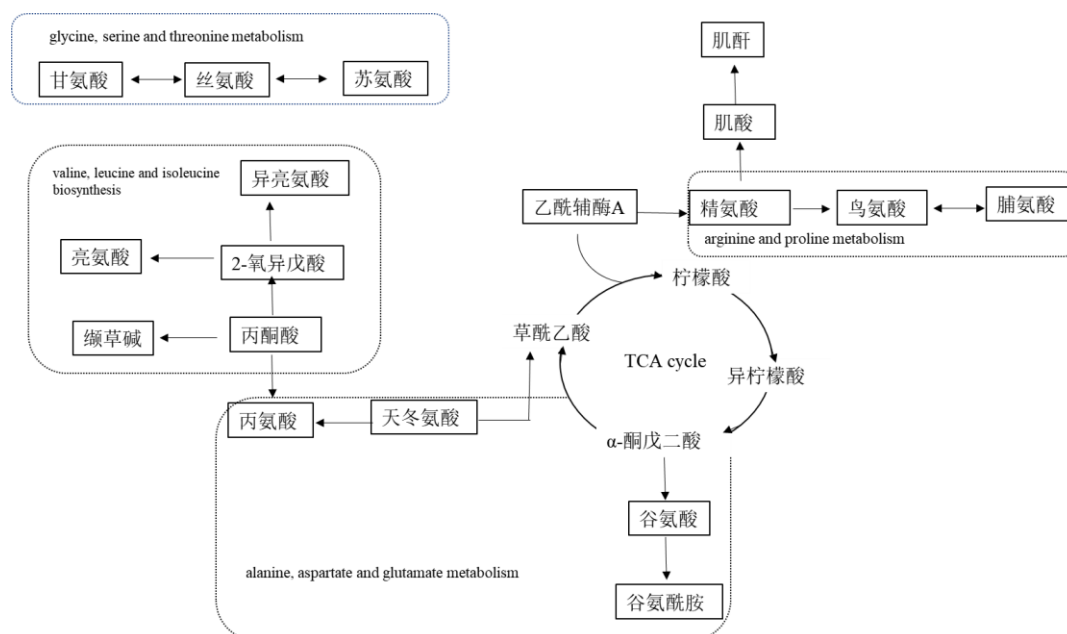


图 10 天丝饮对慢性应激大鼠代谢通路的影响

Fig. 10 Effects of Tiansi liquid on metabolism pathway of chronic stress rats

影响^[13]。本研究水迷宫定位航行实验结果显示,随着学习次数增加,模型组大鼠与对照组渐拉开距离,实验第 4 天,模型组较对照组潜伏距离延长 ($P < 0.01$)。空间探索实验结果显示,模型组大鼠穿越平

物合成,甘油脂代谢。

3.2.5 整体代谢通路分析 根据对实验结果的影响程度及生物学作用选取 4 条主要代谢通路:精氨酸与脯氨酸代谢通路;甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成;丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路。结合文献检索与 KEGG (<http://www.kegg.com/>) 分析生物合成方向途经后整合代谢通路见图 10。

4 讨论

慢性应激使机体出现抑郁症、学习和记忆障碍、应激性精神紊乱、痴呆、衰老加速等多系统疾患。动物实验研究多采用慢性不可预知性应激造模,常采用的应激因子有束缚、间接电击、惩罚性饮水、噪声、强光、禁水禁食、摇晃、潮湿垫料、温水游泳、冰水浴、热刺激等。研究表明慢性不可预知性应激具有良好的表观有效性、结构有效性及预测有效性。慢性应激造模常用的行为学检测方法是水迷宫 (Morris water maze) 检测,检测视觉线索空间定位能力,主要测试指标是入水到找到平台的游泳时间和距离,测试结果易受视觉能力及运动能力的

台次数较对照组减少 ($P < 0.05$),这些结果表明,慢性应激模型造模成功。在定位航行实验过程中,天丝饮组大鼠与模型组差别也渐明显,实验第 4 天,天丝饮组大鼠较模型组潜伏距离延长 ($P < 0.01$)。

空间探索实验结果显示, 天丝饮组大鼠穿越平台次数较模型组增加。结果表明, 天丝饮能够有效改善慢性应激模型大鼠的行为能力。

核磁代谢组学实验结果显示, 各组间代谢物差异主要体现在氨基酸代谢。氨基酸在许多物质代谢通路中起重要作用, 不仅是重要的酶底物, 也是重要的调节物, 蕴含着反映机体代谢和功能状态的生物化学信息^[14]。其中肌酐、脯氨酸、精氨酸和瓜氨酸涉及的代谢通路为精氨酸-脯氨酸代谢。脯氨酸可以代谢产生电子, 进而产生活性氧 (ROS), 引发多种下游效应, 包括阻断细胞周期、自噬和凋亡^[15]。精氨酸可通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性来抑制氧化应激^[16]。瓜氨酸作为一氧化氮合酶 (NOS) 家族催化精氨酸的副产物, 可以防止氧化损伤^[17]。甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢途径可为三羧酸循环 (TCA 循环) 提供重要的能量代谢前体^[18]。

丙氨酸是抑制性神经递质, 是肌肉组织主要的能量来源, 主要参与蛋白质的合成, 同时参与机体的多种代谢过程^[19]。实验结果显示模型组丙氨酸较对照组增加, 说明模型组大鼠丙氨酸代谢紊乱。天丝饮组较模型组丙氨酸减少, 说明天丝饮可能通过调节丙氨酸代谢, 改善慢性应激损伤。

异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸因为有脂肪族侧链, 称为支链氨基酸 (BCAAs)。研究显示与健康对照组相比, 支链氨基酸浓度在抑郁症患者体内显著降低。BCAAs 浓度的降低会干扰脑内 5-羟色胺 (5-HT) 的释放, 致使出现中枢疲劳^[20]。在本实验中, 模型组较对照组缬氨酸含量减少, 可能为慢性应激导致神经损伤、学习记忆障碍的代谢机制之一。天丝饮组较对照组缬氨酸含量减少, 表明天丝饮并不能改善慢性应激所导致的缬氨酸代谢紊乱, 调节缬氨酸含量不是天丝饮发挥作用的机制。

实验结果除涉及氨基酸代谢外还涉及甘油代谢和糖代谢等。葡萄糖代谢是细胞质在厌氧或有氧条件下将葡萄糖转化为乳酸或丙酮酸的生化过程。甘油代谢是细胞能量生成和脂质合成过程中所必需的。据报道, 甘油摄取减少会抑制机体能量和脂质产生, 从而导致细胞增殖受损^[21]。

丙酮酸是糖代谢的中间产物, 细胞液中的丙酮酸进入线粒体后, 氧化脱羧生成乙酰 CoA, 是连接糖酵解和 TCA 循环的重要环节^[22]。

通路中的 TCA 循环是细胞能量代谢和化学合成路线的核心, 葡萄糖、氨基酸、脂肪酸通过此环

状反应链合成和转化^[23]。氨基酸的合成和相互转化主要通过 TCA 循环进行。

此外, 实验结果涉及的其他代谢物中, 肉碱和脲基乙内酰胺是相对突出的部分。肉碱在自然界中主要有 2 种存在形式: 左旋肉碱和右旋肉碱, 二者结构上互相对称。左旋肉碱是动物体内脂肪酸代谢的必需辅助因子, 它能携带长链脂肪酸通过线粒体外膜进入线粒体基质, 保证脂肪酸 β -氧化顺利完成, 为细胞代谢活动提供能量^[24]。研究表明左旋肉碱具有明显的抵抗机体氧化应激的功能^[25]。本实验结果显示, 模型组较对照组肉碱含量明显减少, 说明慢性应激模型所致神经损伤学习记忆障碍的机制之一是肉碱代谢紊乱。肉碱含量减少, 相应的脂肪酸代谢紊乱, 也是模型组大鼠体质量增加的原因之一。但是给药组大鼠和对照组比较, 肉碱含量也减少, 说明天丝饮并不能改善肉碱代谢紊乱, 不是其发挥作用的机制。

脲基乙内酰胺又名尿囊素, 具有促进细胞生长、加快伤口愈合等生理功能。本实验结果显示, 给药组和对照组比较, 脲基乙内酰胺含量明显增加, 说明天丝饮可增加代谢物脲基乙内酰胺含量, 进而促进细胞生长, 可能是天丝饮发挥作用的机制之一。

综上所述, 天丝饮对慢性应激大鼠血清代谢物有调节作用, 所涉及的代谢物主要为氨基酸类代谢物。

参考文献

- [1] 胡 疆, 张卫东, 柳润辉, 等. 巴戟天化学成分及其生理活性研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2004, 22(4): 196-199.
- [2] 王雪芹, 张鸿燕, 舒 良, 等. 巴戟天寡糖胶囊治疗轻、中度抑郁症的疗效和安全性 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(9): 803-806.
- [3] 李敏芳, 李 慧, 王学美. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4): 102-103.
- [4] 周静洋, 鲁 艺, 徐向青, 等. 天丝饮的抗抑郁作用及其对 IDO 的调节 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(3): 182-185.
- [5] Cheng D, Murtaza G, Ma S Y, et al. In silico prediction of the anti-depression mechanism of a herbal formula (Tiansi Liquid) containing *Morinda officinalis* and *Cuscuta chinensis* [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22101614.
- [6] 王垚涵, 胡嘉元, 李亚博, 等. 天丝饮对 A β 25-35 所致阿尔茨海默病模型大鼠的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(11): 1103-1106.
- [7] 郑俊超, 畅洪昇, 马素亚, 等. 天丝饮中多糖成分对

- H₂O₂ 损伤 SH-SY-5Y 的保护作用对比研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3717-3720.
- [8] 李春雨, 王 张, 王 平, 等. 基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 918-922.
- [9] 马天宇, 俞腾飞, 李树民, 等. 乌头类中药毒代动力学及代谢组学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1972-1975.
- [10] 江春迎. 基于核磁共振的定量代谢组学对金黄地鼠脂代谢紊乱模型的跟踪研究及调血脂药物药效学评价 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [11] 范玛莉, 邢 婕, 李震宇, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍与赤芍化学成分比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3230-3237.
- [12] 周本宏, 陈 鹏, 涂 杰, 等. 石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠内源性物质代谢的影响及代谢通路分析 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2072-2080.
- [13] 马素亚, 郑俊超, 程 丹, 等. 慢性应激所致学习记忆障碍及中药干预研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5032-5035.
- [14] 梁国荣, 曾瑞峰, 温丹婷, 等. 心衰阳虚证血浆氨基酸 (缬、苯丙、异亮、亮氨酸) 代谢指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3735-3738.
- [15] Selen E S, Bolandnazar Z, Tonelli M, *et al.* NMR metabolomics show evidence for mitochondrial oxidative stress in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3284-3291.
- [16] Jimenez M D, Martin M J, Alarcón De La Lastra C, *et al.* Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38(9): 903-911.
- [17] Phang J M, Liu W, Zabirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress [J]. *Annu Rev Nutr*, 2010, doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104638.
- [18] Lewis E D, Richard C, Goruk S, *et al.* The form of choline in the maternal diet affects immune development in suckled rat off spring [J]. *J Nutr*, 2016, 146(4): 823-830.
- [19] 岳子敬. 肥胖人群不同中医体质类型的代谢组学比较研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [20] Blomstrand E. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue [J]. *J Nutr*, 2006, 136(2): 544S-547S.
- [21] Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, *et al.* Glycerol metabolism in the human liver: Inhibition by ethanol [J]. *Science*, 1965, 150(3696): 616-617.
- [22] 曲卫玲. 基于代谢组学的琼玉膏延缓衰老作用评价及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [23] 朱钦士. 正转和反转的三羧酸循环 [J]. 生物学通报, 2015, 50(1): 16-19.
- [24] 徐少辉, 武书庚, 张海军, 等. L-肉碱生理作用及其机理的研究进展 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(3): 357-363.
- [25] 王秋举, 鞠 雪, 王清滨, 等. L-肉碱对 vero 细胞抗 H₂O₂ 氧化应激的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(13): 42-47.