

• 综 述 •

代谢组学在逍遥散抗抑郁药理研究中的应用

高 耀^{1,2}, 李 肖^{1,2}, 周玉枝^{1,2}, 高晓霞^{1,2}, 田俊生^{1,2*}, 秦雪梅^{1,2*}

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

摘 要: 代谢组学作为系统生物学的重要组成部分, 是与表型更接近的组学, 具有整体性、客观性、灵敏性和动态性的特点, 使其在中医药研究领域得到迅速的应用和推广。归纳总结代谢组学在逍遥散抗抑郁药理机制、药效标志物筛选、抗抑郁新药研发等方面的应用进展。研究结果发现逍遥散可以通过能量代谢和肠道菌群代谢途径的纠偏作用达到治疗效果; 氨基酸、糖类等物质可能是抑郁症的诊断标志物或逍遥散抗抑郁的疗效标志物; 在充分挖掘逍遥散抗抑郁作用科学内涵的基础上, 创制抗抑郁中药新药, 为经典方剂的传承与发展提供新思路, 探索新途径。

关键词: 代谢组学; 逍遥散; 抗抑郁; 药效标志物; 中药新药

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)14-3453-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.028

Application of metabolomics in antidepressant pharmacological research of Xiaoyao Powder

GAO Yao^{1,2}, LI Xiao^{1,2}, ZHOU Yu-zhi^{1,2}, GAO Xiao-xia^{1,2}, TIAN Jun-sheng^{1,2}, QIN Xue-mei^{1,2}

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

2. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006, China

Abstract: Metabolomics, as an important part of systematic biology, is more closely related to phenotype, and has the characteristics of integrity, objectivity, sensitivity and dynamics, which enables it to be rapidly applied and popularized in the research field of traditional Chinese medicine. In this paper, the application of metabolomics in antidepressant pharmacological research, screening of pharmacodynamic markers and development of new antidepressant drugs were summarized. Xiaoyao Powder can achieve the therapeutic effect through the rectifying effect of energy metabolism and intestinal microflora metabolism. Amino acids, sugars, and other substances may be the diagnostic markers of depression or therapeutic markers of Xiaoyao Powder. On the basis of fully exploring the scientific connotation of the antidepressant effect of Xiaoyao Powder, a new antidepressant medicine was created to provide new ideas and explore new approaches for the inheritance and development of the classic formula.

Key words: metabolomics; Xiaoyao Powder; antidepressant; pharmacodynamic marker; new Chinese materia medica

逍遥散方出自宋代《太平惠民和剂局方》, 为疏肝解郁、调和肝脾的代表方剂, 临床及实验研究均已证明了该方有确切的抗抑郁效果, 成为治疗抑郁症常用的经典名方之一^[1-3]。近年来, 代谢组学继基

因组、蛋白质组之后逐渐成为系统生物学的重要组成部分, 是以分析生物体内相对分子质量较小的代谢物为对象, 从而表征和解析生命活动状态的一种新技术。与其他组学技术

收稿日期: 2019-03-16

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX090301047); 中国博士后科学基金面上资助项目(2016M602414); 山西省科技重点研发计划项目(201603D3113013); 山西省科技重点研发计划项目(201603D321077); 山西省自然科学基金项目(201701D22111344); 山西省重点实验室资助项目(201605D111004); 山西省科技创新重点团队资助项目(201605D131045-18); 山西省研究生教育创新项目(2016SY007); 山西省研究生教育创新项目(2017JD02)

作者简介: 高 耀(1990—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药网络药理学。Tel: 18734823114 E-mail: 18734823114@163.com

***通信作者** 秦雪梅, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药精神神经药理研究, 中医药代谢组学研究。Tel: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn
田俊生(1980—), 男, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0351)7019297 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

相同,具有整体系统性;但与基因组学和蛋白质组学相比,是表征生物学事件发生后的代谢指纹,不是预测而是结果。因此,更具有准确性,是最接近表型的组学技术,被国内外学者当作解决传统中医药关键科学问题强有力的技术工具。

逍遥散方因其整体调节、辨证论治、个体化诊疗等理念的渗透,在抑郁症治疗方面显示了明显的优越性^[3]。代谢组学具有整体性、客观性、动态性和准确性的特点,与中医药学的整体观、证候等理

论不谋而合。因此,借助代谢组学思路从系统生物整体的角度探究逍遥散抗抑郁药效评价及作用机制研究具有重要意义。

利用代谢组学对逍遥散抗抑郁方面的研究(图1)主要包括逍遥散剂量筛选、模型筛选、药效特点评价、药效动力学考察、抗抑郁药理机制研究、代谢组学与分子药理学相关性分析、药效标志物筛选和抗抑郁新药研发等方面,以期为经典方剂的传承与发展提供新思路。

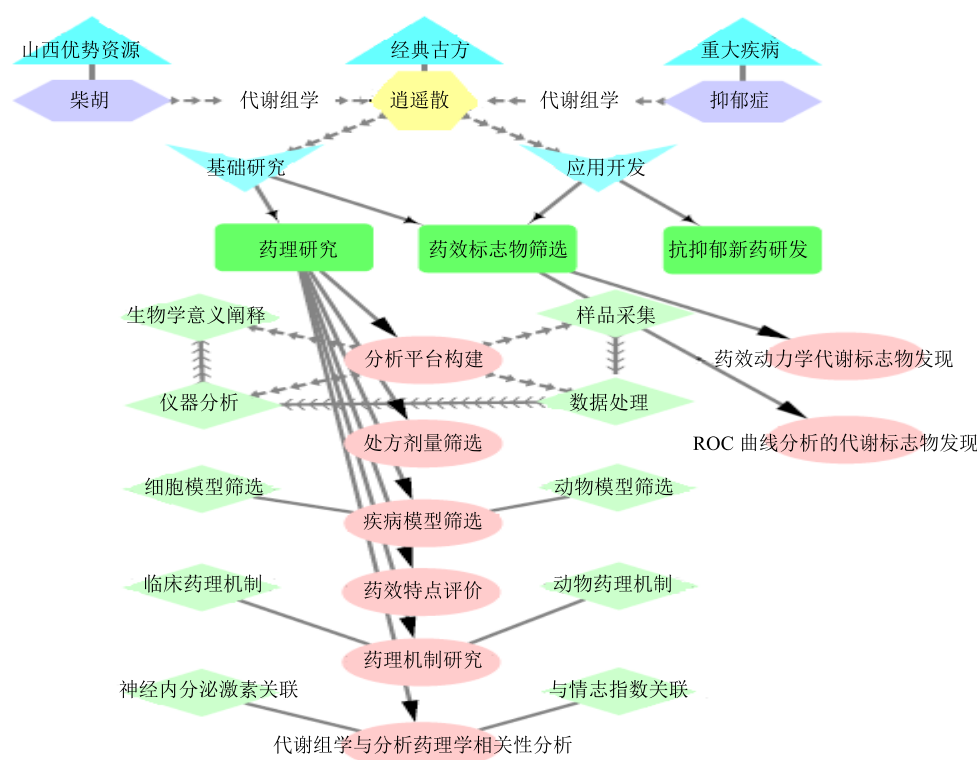


图1 逍遥散抗抑郁代谢组学研究思路示意图

Fig. 1 Schematic diagram of antidepressant metabolomics study of Xiaoyao Powder

1 代谢组学用于逍遥散抗抑郁药理研究

1.1 代谢组学的分析平台构建

代谢组学按研究目的可分为非靶向代谢组学和靶向代谢组学。非靶向代谢组学无偏向性地对所有小分子代谢物同时进行检测分析。靶向代谢组学仅对目标代谢物进行同时定量分析。目前靶向代谢组学已成为主流趋势。在代谢组学分析过程中,不同样本处理方法影响化合物表征,不同数据处理方式影响结果分析,不同的技术平台各有优势,所以代谢组学不同环节技术的规范化至关重要。

因此,实验室建立了不同技术的代谢组学分析平台,规范了样品的类别、样本的采集、样品的制

备、数据的采集及多元统计分析和生物学意义阐释等环节操作,保证了整个研究结果的可靠性和重现性。在样品类别方面,建议除关注血液、尿液,还可关注粪便(研究宿主、肠道菌群及两者相互作用)、细胞(重现性好、成本低)、模式生物(果蝇、线虫、斑马鱼)。在样品采集方面,血浆所含代谢物数量显著少于血清,因此建议选取血清;血液样本在常温下,凝结时间为40 min~2 h时,分离效果最好,避免溶血;血浆建议使用肝素钠作为抗凝剂。在样品制备方面,血清可采用甲醇沉淀蛋白法增强谱峰信号;尿液建议通过测定尿肌酐,确定取样体积后冻干,称取相同冻干粉进行分析;乙腈与甲醇相比,

虽除蛋白较彻底,但使用甲醇可使样品中的代谢物保留更多,因而建议采用甲醇;组织样本制备尽量采用两步萃取法,尽可能获取较多信号。

在数据采集与处理方面,核磁共振技术(NMR)、气质联用技术(GC-MS)和液质联用技术(LC-MS)相互独立,但也有一定的互补性。在数据的多元统计分析方面,代谢组学数据预处理/数据统计软件算法各不相同,呈多样化,需要采用多种软件进行交互验证以获取准确的信息;具体过程包括归一化、数据转化、中心化、标准化等步骤。只有经过预处理,实现对数据的简化和降维,建立可靠的数据模型。应用于代谢组学数据分析的模式识别方法主要包括非监督学习方法和有监督学习方法。非监督学习方法主要有主成分分析法(PCA)、非线性映射、簇类分析等。有监督学习方法主要有偏最小二乘法(PLS)、神经网络改进方法、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)、正交偏最小二乘法(OPLS)等,其中 PCA 和 PLS-DA 是代谢组学常用的模式识别方法。代谢组学研究中,尿液的变异最大,建议使用总峰面积或渗透浓度归一化法。

在生物意义阐释方面:一个代谢物可能涉及多条通路,一种疾病可能涉及多个代谢物,MetPA 分析可以确定贡献大的代谢通路;MetScape(Cytoscape APP 插件)可以将代谢物、蛋白以及相应的调控基因进行关联;相似的软件还有 Grinn、MetaMapR。同位素示踪可以追踪单个同位素原子在整个代谢过程中的轨迹,因而可以辅助确定代谢物代谢的具体生化途径。

此外,在临床代谢组学尿液样本研究中,为了消除尿液中的代谢物因尿液量、尿液浓度等的不一致而导致实验结果的差异,根据尿液中肌酐平均含量情况确定所需的尿液量,并在定量分析的结果中以肌酐为单位对尿液中代谢物进行浓度校正,既能保证各组之间实验结果的可比性和准确性,又能满足实验方法的科学性^[4]。

1.2 代谢组学用于逍遥散处方剂量筛选

临床及实验研究均证明逍遥散有确切的抗抑郁作用,但是用药剂量却存在差异,在《太平惠民和剂局方》中,提到了处方量,但无法准确判断用量;《中国药典》2015 年版一部收载的逍遥散中成药共有 6 个品种,包括逍遥散(大蜜丸)、逍遥散(水丸)、逍遥颗粒、逍遥丸(浓缩丸)、逍遥胶囊和逍遥片,但日服剂量也不尽相同^[5]。崔杰等^[6]依据古典记载,

按药理学的等倍关系设计,2 次实验重复考察了逍遥散的 4 个不同的剂量。在观察行为学结果的同时,收集尿液样品,采用 GC-MS 代谢组学数据分析方法,发现逍遥散高剂量组,即生药量 46.3 g/kg,相比其他剂量组具有更好的抗抑郁作用,与文拉法辛组作用效果较为接近。

代谢组学用于逍遥散干预剂量筛选的实验方法非常重要。代谢组学结果与行为学结果相互印证,为临床合理用药提供实验依据。

1.3 代谢组学用于模型筛选

1.3.1 动物模型的筛选 随着社会竞争的加剧,抑郁症的发病率呈逐年上升的趋势,而抑郁症发病机制复杂,诱因多,病理机制的研究尚不完全清楚,对抗抑郁中药新药研究非常迫切,这些研究工作必须依靠抑郁动物模型完成,而动物模型模拟人类疾病状态的程度直接影响新药研究结果的价值。

应激抑郁模型的造模手段与临床抑郁症患者的病因相似,所以成为最常用的抑郁动物模型,主要的应激抑郁模型有慢性温和不可预知应激(CUMS)抑郁模型与慢性束缚应激(CRS)抑郁模型,目前研究多从行为学及单胺类神经递质进行,不能全面反映模型大鼠整体代谢物的变化。

郑兴宇等^[7]利用 NMR 的代谢组学方法比较 CUMS 与 CRS,行为学及代谢组学均显示 CUMS 组造模比较成功,CRS 组在行为学指标上较差,但运用代谢组学技术显示造模成功,说明代谢组学方法比行为学更灵敏。Shi 等^[8]比较 3 种基于压力的抑郁症模型的代谢组学特征,研究了急性和慢性应激对全身内源性代谢物产生的影响。代谢组学研究表明,不同血浆代谢物的浓度可用于区分抑郁模型:在 CUMS 模型中三甲胺(TMA)、天冬氨酸、谷氨酸、乙酰乙酸(AcAc)、N-乙酰糖蛋白(NAc)、丙氨酸、乳酸、亮氨酸/异亮氨酸(Leu/Ile)、脂质水平增加和脯氨酸、 β -羟基丁酸(β -HB)、缬氨酸水平减少;强迫游泳 1 d(FST-1d)模型中 TMA 含量降低;在强迫游泳 14 d(FST-14d)模型中, β -葡萄糖、 α -HB、缬氨酸和脂质含量增加。表明代谢组学是评估抑郁症模型的潜在适宜方法。根据代谢组学研究,CUMS 模型比急性 FST-1d 模型和可预测的 FST-14d 模型更适合和敏感。CUMS 模型更适合于研究抗抑郁药的药效及其作用机制,而 FST-14d 模型仅用于评估治疗效果。薛黎明等^[9]发现模型组尿液动态分析显示 CUMS 模型在造模第 18 天开始显

效,至 21 d 建造成功;显示 CUMS 模型造模 21 d 合理。综上所述,代谢组学方法可用于不同疾病模型的评价和筛选,为疾病动物模型的选择提供可靠的依据。

1.3.2 细胞模型的筛选 抑郁症由于发病机制较为复杂,除动物模型外目前体外实验中常用于建立抑郁症的细胞模型有 PC12 细胞、SH-SH5Y 细胞、原代培养的神经元细胞等。由于 PC12 细胞具有操作简单、容易获得等特点,使其在抑郁症研究中应用广泛。

建立 PC12 抑郁症细胞模型时常用的刺激物质包括谷氨酸和皮质酮(CORT)等。谷氨酸与皮质酮诱导神经元细胞损伤的机制有相似之处也有不同之处,已有研究表明 2 种刺激方式均有使用,但二者所致的抑郁症模型是否有差异、细胞内外代谢产物有何异同、哪一种与临床抑郁症的发生发展更为接近,目前尚不清楚。何小燕等^[10]应用 ¹H-NMR 代谢组学技术分析 CORT 和谷氨酸诱导 PC12 细胞后细胞及其培养液中代谢产物的变化,比较诱导后的细胞与空白对照组代谢产物的差异性,并结合多元统计分析和代谢通路分析探讨 2 种诱导方式所致抑郁症细胞模型的特点,结果表明 CORT 刺激下,其影响的主要是脂肪和脂肪酸的转化以及细胞膜结构,而谷氨酸刺激下,主要对糖酵解过程以及抗氧化过程有影响。Tian 等^[11]采用质子核磁共振(¹H-NMR)代谢组学方法,进一步研究 CORT 诱导的 PC12 细胞的潜在代谢特征,并评估用于抑郁研究的合适分化类型的 PC12 细胞。结果显示,在 CORT 处理中,3 种分化的 PC12 细胞分别在细胞内和细胞外提取物中有 8 种和 13 种常见的差异代谢物,扰乱的代谢途径涉及氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢、丙酮酸代谢和肌醇磷酸代谢。结果表明 CORT 诱导的 PC12 细胞的代谢与抑郁的发病机制类似,并且低分化的 PC12 细胞是不同类型分化的 PC12 细胞中最适合抑郁研究的细胞。因此,其可以成为参考评估体外疾病模型的有效预测策略。

代谢组学技术相比常规方法(行为学指标、生化指标)具有灵敏、整体、直观性的优点,因此可用于抑郁症模型的筛选,对不同模型药效特点提供新依据。

1.4 代谢组学用于药效特点评价

郭晓擎等^[12]采用 CUMS 大鼠模型,从动物行为学和 ¹H-NMR 代谢组学 2 方面观察不同品种柴胡组

成的逍遥散的抗抑郁作用及其对大鼠内源性代谢产物变化的影响,结果表明不同品种柴胡组成的逍遥散对抑郁大鼠行为学指标均有显著影响,大鼠血清中异亮氨酸、氧化三甲胺、胆碱水平升高,而乳酸、N-乙酰糖蛋白、肌酸、苏氨酸及 β -葡萄糖等水平降低,与模型组比较差异显著。表明不同品种柴胡组成的逍遥散均具有明显的抗抑郁作用,但功效有所差别,即南柴胡组成逍遥散的抗抑郁效果及起效时间略优于北柴胡。

应用行为学与代谢组学相结合的方法评价不同柴胡组成的逍遥散抗抑郁功效具有准确性好、灵敏度高等特点。代谢组学技术为中药在复方中功效的评价提供方法。文拉法辛和氟西汀是目前治疗抑郁症较为常用的药物,在临床上对抑郁症都具有确切的疗效。对二者的研究大多是从临床角度进行探讨,不能全面反映药物调节机体的过程。薛水玉等^[13]采用代谢组学技术比较并评价文拉法辛和氟西汀 2 种药物的抗抑郁药效及作用机制。代谢组学分析结果显示,散点图中文拉法辛距离正常对照组较近,其抗抑郁效果较优,通过正常对照组与模型组的载荷图寻找出了 CUMS 抑郁模型的 15 个潜在生物标志物,文拉法辛能回调的标志物比氟西汀多。正是基于这一评价结果,本课题组在以后中药抗抑郁的研究均已文拉法辛为阳性对照药。

因此,采用代谢组学技术分析了 2 种不同药物对疾病有关标志物的回归调节作用及机制比较研究,为药物药效的评价和机制研究提供了新思路和新方法。

1.5 代谢组学用于抗抑郁药理机制研究

逍遥散在治疗应激引起的复杂疾病如抑郁症,因其整体调节、辨证论治、个体化诊疗等理念的渗透,显示了明显的优越性。李金兵等^[14]对利用代谢组学技术分析 CUMS 诱导的抑郁症发病机制的研究进展进行综述。采用代谢组学技术发现 CUMS 模型诱导的抑郁症病理机制与多种内源性代谢物有关,按化学类别内源性代谢物可以分为氨基酸、脂肪酸、糖类、核苷酸、脂蛋白、N-乙酰糖蛋白、苯丙乙酰甘氨酸、胆碱、胆酸、溶血磷脂酰胆碱等物质;按代谢途径可以分为氨基酸代谢、能量代谢、肠微生物代谢、酮体代谢等途径。抑郁症病理机制不是某个代谢途径异常或某个特定区域单独受到扰动的结果,而是多个代谢途径异常或者多个区域的联合效应。

前期基于不同分析技术对模型大鼠的尿液^[15-17]、血清^[18-19]、海马组织^[20-21]、盲肠组织^[22]和粪便^[23]分别进行了代谢组学研究,并识别多个抑郁症密切相关的潜在生物标志物。不同检测技术具有互补性,虽然这些技术鉴定的标志物不尽相同,但多归属于同一通路,且为上下游关系;且还发现了与其他技术不同的代谢物,如嘌呤类代谢物仅被 LC-MS 技术发现,NMR 发现的极低/低密度脂蛋白和高密度脂蛋白等大分子代谢物,乳酸、甘油、 γ -氨基丁酸、肌醇和亚油酸等挥发性成分易被 GC-MS 发现鉴定。这些研究结果表明,这些分析技术对抑郁症的代谢轮廓的研究具有互补性,且在一定程度上可以相互验证,获得最广泛全面的疾病代谢调控网络。

陈建丽等^[24]从神经递质、神经营养素、下丘脑-垂体-肾上腺轴、氨基酸、脂质和能量代谢以及炎症因子等方面对逍遥散抗抑郁机制进行分析,归纳总结了逍遥散抗抑郁的代谢网络调控机制。结果显示逍遥散能多途径、多靶点地调控机体代谢紊乱,维持能量代谢、糖代谢、脂代谢、免疫和肠道菌群等代谢通路的平衡,达到治疗抑郁症的目的,以期为全面阐释逍遥散抗抑郁作用机制及抗抑郁中药新药的研发提供理论依据。此外,代谢组学发现了抑郁症与能量代谢异常和肠道微生物代谢途径异常的相关性,这一结果与临床上抑郁症患者代表性症状“疲劳”和“食欲不振”高度吻合,而逍遥散通过对上述 2 个代谢途径的纠偏作用达到治疗效果。

同样,罗和古等^[25]探讨 CRS 大鼠代谢网络改变和逍遥散作用机制,发现 CRS 发生的代谢终产物的改变以脂类物质更明显。逍遥散对代谢终产物有明显的调节效应。徐舒等^[26]也发现逍遥散对肝郁证的治疗作用在代谢物水平通过对机体的整体调节发挥治疗作用。突显了逍遥散抗抑郁作用在能量代谢和肠道微生物代谢方面的优越性。

1.6 代谢组学与分子药理学相关性分析

逍遥散抗抑郁的分子药理机制研究主要从调节单胺类神经递质、内分泌、抗炎和抗氧化等方面证实逍遥散的药理作用与机制,史碧云^[27]发现了逍遥散有效部位对 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号转导通路的调节作用机制。陈磊等^[28]基于神经内分泌激素和代谢组学关联分析复方柴归方抗抑郁作用机制。结果分析表明下丘脑-垂体-甲状腺轴与糖代谢、氨基酸代谢、胆碱代谢均有一定联系,下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴与糖代谢和氨基酸代谢相关,而下丘

脑-垂体-性腺轴与糖代谢有关。高耀等^[29]采用网络药理学技术分析逍遥散抗抑郁神经-内分泌-免疫机制;Gao 等^[30]利用 Metscape 将代谢组学数据与网络药理学技术结合发现 CUMS 大鼠中的差异代谢物参与酶和基因的代谢网络,包括鞘脂代谢、糖代谢、氨基酸代谢、甘油磷脂代谢、脂肪酸代谢和胆汁酸代谢。

代谢组学从客观发现的差异代谢物,反向推测代谢途径,发现了与神经递质、炎症因子、氧化效应、内分泌激素(肾上腺皮质激素)的相关性,其变化趋势与分子药理学结果一致,从而佐证了分子药理学研究结果。

2 代谢组学用于抑郁症代谢标志物筛查

2.1 基于药效动力学的代谢标志物发现与验证

抑郁症是由多种因素引起的情感障碍性疾病,抑郁症的病机不清。用于抑郁症研究的动物实验多以行为学作为判断标准,也有很多研究发现神经递质的异常与抑郁程度有密切关系,前期发现许多与抑郁症相关的小分子代谢物,但哪些神经递质和代谢物可作为抑郁症的生物学效应指标尚不清楚。

郭秉荣^[31]以行为学为基准,从神经递质及小分子代谢物组中筛选并经阳性药验证,筛选出效应指标,并综合行为学指标作为药效指标进行逍遥散药效动力学研究,有望为抑郁症的客观诊断及药物的药效判断提供有效手段。具体方法:首先以神经递质和差异代谢产物作为待筛选指标,并且建立效应指标含量测定方法。其次以行为学指标(体质量、糖水偏爱率、直立次数、水平穿格数)为基准,构建客观的情志指数;以情志指数为基准进行 PCA 和相关性分析,筛选出与抑郁症密切相关的效应指标(神经递质和差异代谢产物);通过给予逍遥散和文拉法辛,仍以行为学为标准进行 PCA 和相关性分析,筛选效应指标获得药效指标。最后进行药效动力学研究(不同的时间点),建立药效-时间曲线,计算药效动力学参数验证药效指标,如图 2 所示。

郭秉荣^[31]发现了与抑郁症密切相关的效应指标共 8 种(去甲肾上腺素、5-羟色胺、甘氨酸、谷氨酸、葡萄糖、果糖、柠檬酸和棕榈酸)。进一步筛选并验证出 4 种效应指标(去甲肾上腺素、5-羟色胺、甘氨酸和果糖)。在造模与给药前后体内含量变化趋势与行为学变化趋势相似,提示可用作抑郁症临床诊断辅助指标。

采用药效动力学的代谢标志物发现,对药效指

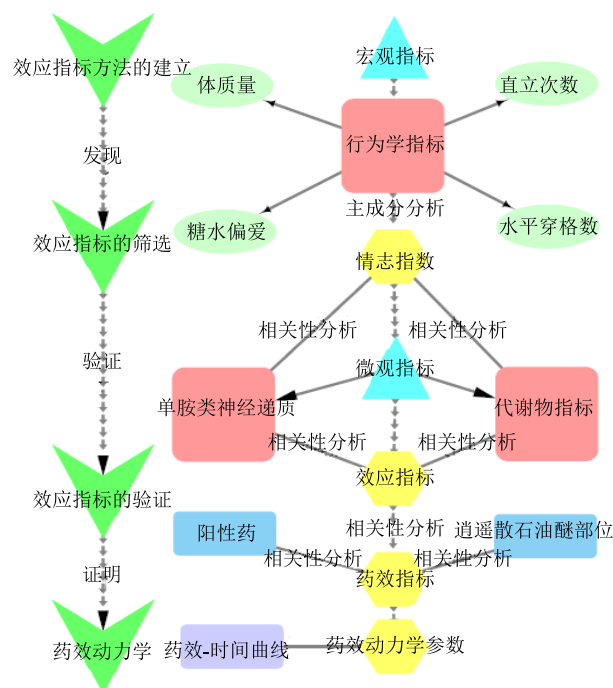


图 2 药效动力学的代谢标志物发现与验证示意图

Fig. 2 Schematic diagram for discovery and verification of metabolic markers of pharmacokinetics

标进行初步验证,表明逍遥散和文拉法辛有相似的抗抑郁作用。药效指标的专属性和临床应用性有待进一步考察。

2.2 基于受试者工作特征(ROC)曲线分析的代谢标志物发现

代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,在临床医学领域具有广泛的应用前景。代谢组学在临床诊断上有广阔的发展前景,无论是在临床诊断中生物标志物的发现、疾病的病因与病理机制中的研究应用,还是在临床用药指导中的应用都将发挥着重要的作用。目前,代谢组学研究在疾病诊断中取得了重大的成果,比如在心血管、糖尿病、肿瘤及代谢类疾病的诊断。在临床治疗中,患者病情变化、对药物的反应等外在表现有时是细微的,而传统手段往往不能准确监测,此时采用代谢组学方法结合传统的检测手段将为治疗提供更精确的指导。

抑郁症是一种复杂的精神类疾病,逍遥散是治疗抑郁症最常用的经典古方,作用机制比较复杂,缺乏客观的整体药效学评价体系。此外,临床上抑郁症复杂,人与动物存在一定的差异。因此,在前期动物实验的基础上,依据汉密尔顿抑郁量表(HAMD)、临床疗效总评量表(GCI)与中医证候量表中关于抑郁症诊断及排除标准,纳入符合要求的

抑郁症患者。采用 $^1\text{H-NMR}$ 、GC-MS和LC-MS3种技术手段,对抑郁症患者服用逍遥散前后以及健康对照组受试者的血液和尿液进行代谢组学分析,从而对逍遥散的临床抗抑郁疗效进行分析^[1,3,32-35]。

血液^[33-34]中共筛选出31种与逍遥散抗抑郁疗效相关的生物标志物,包括氨基酸类(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸)、有机酸类(乳酸和草酸)、胺类(氧化三甲胺、谷氨酰胺以及神经酰胺)、脂肪酸(硬脂酸、十七碳二烯酸)、脂类(溶血性磷酸酰胆碱、鞘脂)、酰基肉碱类(carnitine C10:4和carnitine C14:2)以及其他类(葡萄糖、胆碱)等。

尿液^[1,35]中共筛选出10种与逍遥散抗抑郁疗效相关的生物标志物,包括氨基酸类及其衍生物(酪氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、马尿酸)、有机酸类(柠檬酸、乳酸、黄尿酸、牛磺酸、 α -酮戊二酸)以及胺类(二甲胺)。这些代谢物参与机体的神经递质合成、能量代谢以及肠道菌群活动等3方面,为逍遥散的抗抑郁临床疗效评价研究提供了一定的科学基础。

依据ROC曲线下面积 >0.7 和动态趋势一致性从上述成分筛出的潜在标志物(检测方法)为血液5种:乳酸(NMR)、氧化三甲胺(NMR)、苯丙氨酸(NMR)、草酸(GC)、硬脂酸(GC),可采用括号标示的仪器测定;尿液6种:乳酸(NMR)、肌酐(NMR、LC)、苯丙氨酸(GC、LC)、丙氨酸(NMR、GC一致)、酪氨酸(GC、LC)、柠檬酸(3种方法均可测人与动物)。抑郁症患者服用逍遥散后,尿液和血浆中代谢物的变化得到了有效的调节,向健康人的代谢物水平发生显著的回调。研究进一步证实逍遥散治疗抑郁症疗效确切。

通过ROC曲线分析筛选出与逍遥散临床抗抑郁疗效相关的潜在生物标志物,为逍遥散临床评价体系的建立奠定了基础。临床代谢组学发现的潜在生物标志物还需要加大样本量,采用靶标代谢组学对筛选出的标志物进行定量测定,建立逍遥散抗抑郁疗效的客观评价指标。同样,掌握药物的毒副作用是保证疗效的重要条件,代谢组学技术发挥着其特有的优势,为安全用药提供了有效指导。通过对患者用药前后机体代谢组学分析,可达到预测药物毒副作用的目的,同时还可找出潜在的毒副作用生物标志物,对药物安全性研究具有指导意义。

3 代谢组学用于抗抑郁新药研发

代谢组学已经作为一种重要的技术被应用于候

选药物的药效评价之中,许多生物化学、药理学和毒理学问题可以用代谢组学方法阐明。新药发现和开发领域中,药物靶点发现是很重要的,通过高通量筛选方法发现新的生物活性物质。但新药的作用最终在整体动物的药理和疾病模型上予以证实,才能将具有生物活性的化合物转化为候选化合物进入开发研究阶段。

前期研究发现逍遥散石油醚萃取组分的抗抑郁效果最佳;然而,石油醚易燃易爆且毒性较大,不适合工业生产和萃取药物。对方经活性评价重新化裁处方、提取精制进行药效学筛选,得到了复方柴归方 75% 乙醇提取物醋酸乙酯萃取物(FFCGF-EE)可作为新药开发对象。从代谢组学角度研究 FFCGF-EE 的抗抑郁机制,进一步验证了从逍遥散古方中开发现代药物这一研究策略的正确性和可行性。CUMS 实验中综合体质量及外观、旷场实验、糖水偏爱实验、高架十字迷宫实验等行为学指标得出,FFCGF-EE 中剂量和高剂量与逍遥散原方药效相当,且与阳性药物效果接近。应用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术整体分析得到了抑郁模型大鼠及 FFCGF-EE 干预后的代谢表型谱,鉴定了与抑郁症相关的乳酸、亮氨酸、胆碱 C 等 6 种特征代谢物,而 FFCGF-EE 可以调节特征代谢物趋近正常,其抗抑郁作用机制可能涉及糖代谢、氨基酸代谢、胆碱代谢等环节的调控。结果表明 FFCGF-EE 具有明确抗抑郁作用,可以替代原方逍遥散进一步深入开发^[36-37]。

代谢组学作为一种系统方法,在新药研发中发挥巨大的作用。代谢组学研究可以区别不同动物模型的代谢状态,寻找人体疾病状态的代谢差异,寻找更适合研究人类疾病的动物模型。同样,基于代谢组学可以发现药物治疗疾病的新靶点,为新药评价提供新的思路与方法。

4 结语与展望

本文总结了代谢组学在逍遥散抗抑郁药理研究中的应用。代谢组学技术发现逍遥散可以通过能量代谢和肠道菌群代谢途径的纠偏作用达到治疗的效果,完善逍遥散抗抑郁的药理机制;解决逍遥散治疗抑郁症有效给药剂量关键问题,为临床推广逍遥散治疗抑郁症提供了标准化治疗方案;筛选的氨基酸、糖类物质可能是抑郁症的诊断标志物或逍遥散抗抑郁的疗效标志物,有望突破抑郁症药物治疗尚无客观疗效判定指标的瓶颈问题,为临床上指导与推广逍遥散合理用药提供依据;在充分挖掘经典

方剂逍遥散抗抑郁作用科学内涵的基础上,研发抗抑郁新药——柴归颗粒。

代谢组学技术对逍遥散抗抑郁研究意义重大,但仍需在以下几个方面深入研究:首先采用稳定同位素示踪法的代谢组学技术明确代谢途径,聚焦关键的代谢物与关联的代谢酶;其次组学技术上下游的整合分析,不同层次的基因、蛋白、代谢物分子水平的关联分析,确认逍遥散抗抑郁经典机制与新假说;最后采用网络药理学方法对药物与疾病进行关联,阐明逍遥散与抑郁症多成分、多靶点的科学内涵。为中药经典古方的现代研究提供新思路、探索新途径,推进中药现代化与国际化。

参考文献

- [1] Tian J S, Peng G J, Wu Y F, *et al.* A GC-MS urinary quantitative metabolomics analysis in depressed patients treated with TCM formula of Xiaoyaosan [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1026: 227-235.
- [2] Peng G J, Tian J S, Gao X X, *et al.* Research on the pathological mechanism and drug treatment mechanism of depression [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2015, 13(4): 514-523.
- [3] 冯光明, 田俊生, 武嫣斐, 等. 逍遥散治疗抑郁症临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(3): 512-516.
- [4] 彭国荏. 基于尿液代谢组学的逍遥散抗抑郁临床疗效分析 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 崔杰, 郑兴宇, 高晓霞, 等. 逍遥散抗抑郁作用最佳剂量筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 194-198.
- [7] 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.
- [8] Shi B Y, Tian J S, Xiang H, *et al.* A $^1\text{H-NMR}$ plasma metabonomic study of acute and chronic stress models of depression in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 241: 86-91.
- [9] 薛黎明, 代云桃, 秦雪梅, 等. 基于 NMR 逍遥散抗抑郁作用代谢组学研究 [A] // 药理学发展前沿论坛论文集 [C]. 北京: 中国药学会, 2008.
- [10] 何小燕, 陈建丽, 向欢, 等. 谷氨酸和皮质酮诱导的 PC12 抑郁症细胞模型差异性的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 245-252.
- [11] Tian J S, Liu S B, He X Y, *et al.* Metabolomics studies on corticosterone-induced PC12 cells: A strategy for evaluating an *in vitro* depression model and revealing the metabolic regulation mechanism [J]. *Neurotoxicol*

- Teratol*, 2018, 69: 27-38.
- [12] 郭晓擎, 田俊生, 史碧云, 等. 南柴胡和北柴胡组成的逍遥散抗抑郁作用的¹H-NMR代谢组学研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2209-2216.
- [13] 薛水玉, 郑兴宇, 窦春艳, 等. 文拉法辛和氟西汀抗抑郁作用机制和药效特点的代谢组学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 29-33.
- [14] 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.
- [15] Liu X, Zhou Y, Li Z, *et al.* Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: A plasma metabolomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 578-588.
- [16] Dai Y T, Li Z Y, Xue L M, *et al.* Metabolomics study on the anti-depression effect of xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 482-489.
- [17] Zhou Y Z, Zheng X Y, Liu X J, *et al.* Metabonomic analysis of urine from chronic unpredictable mild stress rats using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chromatographia*, 2012, 75(3/4): 157-164.
- [18] Gao X X, Cui J, Zheng X Y, *et al.* An investigation of the antidepressant action of xiaoyaosan in rats using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with metabolomics [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(7): 1074-85.
- [19] Gao X, Zheng X, Li Z, *et al.* Metabonomic study on chronic unpredictable mild stress and intervention effects of Xiaoyaosan in rats using gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 690-699.
- [20] 彭国荏, 史碧云, 田俊生, 等. 京尼平抗抑郁作用的¹H NMR代谢组学机制研究 [J]. 药学报, 2014, 49(2): 209-216.
- [21] 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]. 中国药理学杂志, 2013, 48(14): 1160-1164.
- [22] 田俊生, 左亚妹, 孙海峰, 等. GC-MS代谢组学分析逍遥散干预抑郁模型大鼠盲肠代谢物组的变化规律 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1931-1936.
- [23] 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.
- [24] 陈建丽, 田俊生, 周玉枝, 等. 基于代谢网络调控的逍遥散抗抑郁作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2100-2105.
- [25] 罗和古, 陈家旭, 岳广欣, 等. 逍遥散调节慢性束缚应激大鼠代谢组学的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(12): 1112-1117.
- [26] 徐 舒, 陈合兵, 李 洪, 等. “肝郁证”方证的代谢组学研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2718-2721.
- [27] 史碧云. 复方柴归方超临界 CO₂ 萃取组分抗抑郁作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [28] 陈 磊, 刘 欢, 陈建丽, 等. 基于神经内分泌激素和代谢组学关联分析的复方柴归方抗抑郁作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4080-4087.
- [29] 高 耀, 高 丽, 高晓霞, 等. 基于网络药理学的逍遥散抗抑郁活性成分作用靶点研究 [J]. 药学报, 2015, 50(12): 1589-1595.
- [30] Gao X X, Liang M L, 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*, 2017, 8(995): 1-22.
- [31] 郭秉荣. 逍遥散抗抑郁有效部位的药效动力学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [32] 冯光明, 田俊生, 张丽增, 等. 抑郁症患者服药依从性研究进展 [J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(4): 313-316.
- [33] 夏小涛, 孙 宁, 刘彩春, 等. 基于¹HNMR代谢组学的抑郁症生物标志物发现及帕罗西汀干预作用 [J]. 药学报, 2016, 51(4): 595-599.
- [34] 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, 185: 156-163.
- [35] Tian J S, Peng G J, Gao X X, *et al.* Dynamic analysis of the endogenous metabolites in depressed patients treated with TCM formula Xiaoyaosan using urinary ¹H NMR-based metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158(Pt A): 1-10.
- [36] 陈 磊. 复方柴归方抗抑郁组分药效及机理研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [37] 刘 欢. 复方柴归方抗抑郁药效研究 [D]. 太原: 山西大学, 2016.