

• 药理与临床 •

基于 UHPLC-MS 的吴茱萸汤影响虚寒呕吐大鼠尿液代谢谱的研究

姬海南, 王朋倩, 吴茵, 戴丽, 霍海如, 隋峰*, 张淼*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 观察吴茱萸汤对虚寒呕吐大鼠尿液代谢谱的变化, 探讨其治疗虚寒呕吐证可能的作用机制。 **方法** 运用复合法(大黄+顺铂)制备大鼠虚寒呕吐模型, 将大鼠随机分为对照组、模型组、吴茱萸汤组。利用超高压液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS)技术结合主成分分析、偏最小二乘分析等方法对尿液数据进行分析, 鉴定出潜在生物标志物, 通过 VIP 及非参数检验筛选并通过多元化 ROC 曲线验证差异代谢物; 运用 Pathway Analysis 数据库对差异性代谢物进行拓扑分析; 运用 R 和 Cytoscape 进行代谢产物的相关性分析和模块化分析。 **结果** 尿液代谢谱对照组和模型组完全分离, 吴茱萸汤组靠近对照组, 表明模型复制成功, 且吴茱萸汤能够干预大鼠的虚寒呕吐症状, 提示大鼠机体具有恢复到正常状态的趋势。从尿液中筛选出 34 种差异代谢物进行通路分析, 发现虚寒呕吐发挥干预作用可能与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 精氨酸和脯氨酸代谢, 色氨酸代谢, 酪氨酸代谢, 花生四烯酸代谢, 三羧酸循环(TCA 循环)等通路有关; 进行模块化分析发现 10 个模块之间关系密切, 丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸、琥珀酸、丙氨酸、富马酸、苹果酸、异柠檬酸等生物靶点可作为虚寒呕吐模型的标识。 **结论** 吴茱萸汤能够改善虚寒呕吐模型的生理特征, 机制可能与吴茱萸汤调节大鼠体内紊乱的氨基酸代谢、能量代谢及脂代谢等有关。

关键词: 吴茱萸汤; 代谢组学; 尿液; 虚寒呕吐; 氨基酸代谢**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)18-4352-12**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.014

Effect of Wuzhuyu Decoction on urine metabolic spectrum in rats with deficiency cold and vomit based on UHPLC-MS

JI Hai-nan, WANG Peng-qian, WU Yin, DAI Li, HUO Hai-ru, SUI Feng, ZHANG Miao

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To observe the changes of urine metabolic profile of Wuzhuyu Decoction in rats with deficiency cold and vomit, and explore its possible mechanism of treatment of deficiency cold and vomit syndrome. **Methods** A rat model of deficiency cold and vomit was prepared by a composite method (rhucax + cisplatin). Rats were randomly divided into control group, model group, and Wuzhuyu Decoction group. UPLC-MS/MS combined with principal component analysis and partial least squares analysis were used to analyze urine data and identify potential biomarkers. Diversified ROC curves were used to validate differential metabolites; Pathway Analysis database was used for topological analysis of differential metabolites; R and Cytoscape were used for correlation analysis and modular analysis of metabolites. **Results** The urine metabolic spectrum of control group and model group were completely separated. Wuzhuyu Decoction group was close to the control group, indicating that the model was successfully replicated; And Wuzhuyu Decoction can interfere with the symptoms of deficiency cold and vomit in rats, suggesting that the rat body had a tendency to return to normal state. Through modular analysis of 34 urine differential metabolites, the deficiency cold and vomit treatment was revealed to affect biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, arginine and proline metabolism, tryptophan metabolism, tyrosine metabolism, arachidonic acid metabolism, citric acid cycle (TCA cycle) pathways. Modularity analysis revealed that there was close relationship between 10 modules; Alanine, leucine,

收稿日期: 2019-01-18**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81873024); 国家自然科学基金面上项目(81773923)**作者简介:** 姬海南, 硕士学位, 中药学专业。Tel: (010)64087421 E-mail: lilian19901205@qq.com***通信作者** 隋峰, 研究员, 博士生导师, 从事中药药性和药理研究。Tel: (010)64087421 E-mail: suifeng2136@126.com

张淼, 讲师, 博士后, 从事中药药性理论研究。Tel: (010)64087421 E-mail: zhangmiao84@126.com

tyrosine, tryptophan, isoleucine, succinic acid, alanine, fumaric acid, malic acid, isocitrate, and other biological targets can thus be used as markers of deficiency cold and vomit. **Conclusion** Wuzhuyu Decoction can improve the physiological characteristics of the model of deficiency cold and vomit. The mechanism may be related to the regulation of amino acid metabolism, energy metabolism and lipid metabolism in rats.

Key words: Wuzhuyu Decoction; metabolomics; urine; deficiency cold and vomit; amino acid metabolism

呕吐是临床常见症状,表现为上腹部特殊不适感,常伴有头晕、流涎、脉缓、血压降低等迷走神经兴奋症状^[1]。厥阴之胜、耳鸣头眩、愤愤欲吐、胃膈如寒^[2]。此证为《伤寒论》中吴茱萸汤的主治证。中医临床以吴茱萸汤为基础方主要用于治疗各种呕吐相关病症^[3-4]。本课题组对此复方长期研究,发现其对虚寒呕吐有较好的改善作用^[5]。

近年来,代谢组学已广泛应用于中药成分及中药作用机制的研究,以独特的视角解释生命现象,为寻找疾病早期诊断的生物标志物提供了重要技术支持。使用超高液相色谱-质谱联用(UHPLC-MS)进行代谢组学分析,生物样品处理简单,并且能够检测众多的化合物,已成为非靶标代谢产物分析的有效方法。尿液样品连续性、不破坏性和易收集的特点,代谢组学的研究方法具有整体性,能够系统地揭示中药复方的治疗作用。UHPLC-MS与虚寒呕吐复合模型结合的代谢组学研究相关报道较少,因此本研究采用代谢组学 UHPLC-MS 技术,在前期药效学研究的基础上^[5],寻找与虚寒呕吐模型相关的生物标志物,并分析吴茱萸汤对虚寒呕吐大鼠尿液紊乱代谢物的影响,揭示大鼠体内可能受影响的代谢途径,以期进一步阐明吴茱萸汤治疗虚寒呕吐的作用机制。

1 材料

1.1 药材

吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、大枣 *Ziziphus jujube* Mill.、大黄 *Rheum palmatum* L. 购于北京同仁堂,生姜 *Zingiber officinale* Rosc. 购于菜市场,经中国中医科学院中药资源中心鉴定,均符合《中国药典》2015 年版规定。

1.2 仪器与试剂

DV215CD 电子分析天平(Sartorius 公司);电子天平(Mettler Toledo 公司);-80℃冰箱(Thermo Fisher 公司);DIONEX Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo Q Exactive 质谱仪(Thermo Fisher 公司);色谱柱 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Thermo Synchronis 公司);Milli-Q AdvantageA10 型超纯水仪

(美国 Millipore 公司);KQ-250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);X-30R 型离心机(Sigma 公司);高岭土、阿拉伯胶(国药集团化学试剂有限公司);顺铂(批号 15663-27-1, Sigma 公司);甲酸、甲酸铵、甲醇、乙腈(色谱纯, Thermo Fisher 公司)。

1.3 动物

6~8 周龄 SD 雄性大鼠,体质量(200±20)g,许可证号 SCXK-(军)2012-0004,购于军事医学科学院,饲养于中国检验检疫研究院实验动物中心,动物均适应性饲养 1 周后进行正式实验。动物实验操作过程依照中国检验检疫研究院实验动物中心伦理委员会的要求执行。

2 方法

2.1 吴茱萸汤水提物及大黄水提物的制备

吴茱萸汤水提物及大黄水提物按照文献方法^[5]提取得到。经多成分含量分析^[6],吴茱萸汤水提物主要含黄酮和皂苷类化合物,其中含吴茱萸碱 0.245 mg/kg、吴茱萸次碱 0.13 mg/kg、吴茱萸内酯 8.95 mg/kg、6-姜辣素 0.95 mg/kg、芦丁 0.43 mg/kg。

2.2 动物分组与给药

取 30 只大鼠随机分成 3 组,每组 10 只,单笼饲养,分别为对照组、模型组、吴茱萸汤组。对照组大鼠每天 ig 生理盐水 10 mL/kg,连续 15 d,在第 1、10 天 ip 2.0 mL/kg 的生理盐水注射液;模型组大鼠每天 ig 大黄水提液 10 mL/kg(1 mL 相当于生药量 1 g),连续 15 d,在第 1、10 天 ip 30 mg/kg 的顺铂;吴茱萸汤组大鼠每天 ig 大黄水提液 10 mL/kg,0.5 h 后 ig 20 mL/kg(1 mL 相当于生药量 1 g,即其剂量为 20 g/kg^[5])吴茱萸汤,连续 15 d,在第 1、10 天 ip 30 mg/kg 的顺铂。从第 7 天开始,各组大鼠喂以饲料与高岭土混合饲料,第 10 天观察各组大鼠 24 h 内异嗜高岭土行为,并将高岭土饲料取出,分别称质量,计算高岭土的平均耗用量,同时每天称取大鼠体质量。

2.3 尿液样品采集与处理

末次给药后所有大鼠禁食不禁水 24 h,第 2 天取大鼠 6:00~8:00 的晨尿,以 3 500 r/min 转速离心 15 min,分离尿液,置超低温冰箱冷冻保存。分

析前将尿液样品于室温下解冻,取 50 μL ,加入乙腈 450 μL ,涡流 30 s,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液直接进样分析。

2.4 色谱条件

Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪,色谱柱 Thermo Synchronis C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相水(含 0.1%甲酸、2 mmol/L 甲酸铵,A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~1 min,95% A;1~25 min,95%~5% A;25~30 min,5% A;体积流量 0.4 mL/min,进样量 3 μL ,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 质谱(MS/MS²)条件

电喷雾离子源(ESI),采用正、负离子同时扫描模式,电喷雾电压 2.8 kV;鞘气体积流量为 35 arb (1 arb $\approx$ 300 mL/min);辅助气体流量为 10 arb;毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$;一级全扫描(Full scan):分辨率 70 000;扫描范围 m/z 50~750;二级数据依赖性扫描(Full MS/dd-MS²):分辨率 17 500;阶梯归一化碰撞能(Stepped NCE 值)20、40、60 V。

2.6 数据处理

采用数据库 mzcloud 对大鼠尿液内源性代谢物质进行鉴定,利用分子式和相对分子质量确定内源性物质,同时在 Trace Finder 软件进行自建内源性物质。Metlin (<http://metlin.scripps.edu/>)、HMDB (www.hmdb.ca)^[7]及 KEGG^[8-9] (www.genome.jp/kegg/ligand.html) 数据库中进行检索和确认。尿液数据采用肌酐定量归一化处理。本实验采用 Metaboanal yst 3.3.0 进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和拓扑分析,使用 R 统计软件包 R $\times$ 64 3.2.4 (<http://cran.r-project.org>)进行高通量代谢通路分析^[10]。最后用 Cytoscape

(<http://www.cytoscape.org>)及 Metscape 和 MCL 或 MCODE (<http://baderlab.org/Software/MCODE>) 插件绘制内源性物质网络图进行模块化分析。

3 结果

3.1 吴茱萸汤对虚寒呕吐大鼠精神、活动状况及饮食量的影响

实验全程观测大鼠粪便情况、毛色、精神状态、活动状况、行为学等。造模大鼠从造模第 2 天开始出现稀便、进食进水量减少、蜷缩、不好动、并且出现明显的拱背、倦卧、扎堆、眯眼、自主活动减少等现象。随着造模时间的增加,大鼠粪便变得更稀,不易收集。并出现竖毛现象,背部毛发黯淡、毛色无华、晦暗、脱毛等现象,一直持续到造模结束。模型组大鼠体质量增长缓慢,进入给药治疗阶段后,大鼠均表现出明显的食量和体质量增加,各组大鼠体质量整体呈持续性增长,但模型组大鼠体质量明显低于对照组,增长缓慢,推测大黄酒煎液苦寒泻下之效可能是导致大鼠体质量变化的主要原因。吴茱萸汤组大鼠体质量明显高于模型组,提示吴茱萸汤给药后大鼠的虚寒证一定程度上得到了改善。与模型组相比,吴茱萸汤治疗后能够明显减少大鼠的高岭土摄入量。结果见表 1 和 2。

3.2 尿液总离子图及代谢产物鉴别

采用数据库 mzcloud 对大鼠尿液内源性代谢物质进行鉴定,利用分子式和精确相对分子质量确定内源性物质,同时在 Trace Finder 软件进行自建内源性物质数据库。同时在 HMDB 和 KEGG 数据库进行峰比对确认,内源性物质确定方式见图 1。

3.3 多元化分析各组尿液 UPLC-MS 数据的模式识别

采用 PCA 对对照组和模型组大鼠尿液数据进

表 1 各组大鼠的体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Change of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体质量/g							
	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
对照	190.29 $\pm$ 4.27	198.21 $\pm$ 8.81	208.37 $\pm$ 3.97	213.62 $\pm$ 5.32	220.96 $\pm$ 4.09	228.75 $\pm$ 9.28	241.52 $\pm$ 7.51	250.18 $\pm$ 10.39
模型	190.95 $\pm$ 5.42	175.78 $\pm$ 1.34	176.83 $\pm$ 12.40	177.30 $\pm$ 17.22	185.32 $\pm$ 9.81	191.46 $\pm$ 10.45	194.60 $\pm$ 11.07	199.22 $\pm$ 27.20
吴茱萸汤	190.14 $\pm$ 12.90	181.94 $\pm$ 1.12	187.59 $\pm$ 8.04	193.41 $\pm$ 10.80	200.42 $\pm$ 4.01	207.71 $\pm$ 6.55	210.54 $\pm$ 7.37	219.71 $\pm$ 9.45
组别	体质量/g							
	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天	第 14 天	
对照	256.38 $\pm$ 6.59	263.87 $\pm$ 4.35	275.46 $\pm$ 6.37	285.47 $\pm$ 1.95	289.42 $\pm$ 2.24	296.91 $\pm$ 1.96	304.43 $\pm$ 5.43	
模型	203.12 $\pm$ 26.06	192.45 $\pm$ 7.06	199.17 $\pm$ 10.03	203.94 $\pm$ 15.15	204.86 $\pm$ 15.81	205.78 $\pm$ 10.15	206.24 $\pm$ 12.34	
吴茱萸汤	230.09 $\pm$ 9.47	209.51 $\pm$ 7.45	224.39 $\pm$ 9.54	234.17 $\pm$ 2.05	236.60 $\pm$ 9.27	240.10 $\pm$ 8.44	260.71 $\pm$ 9.52	

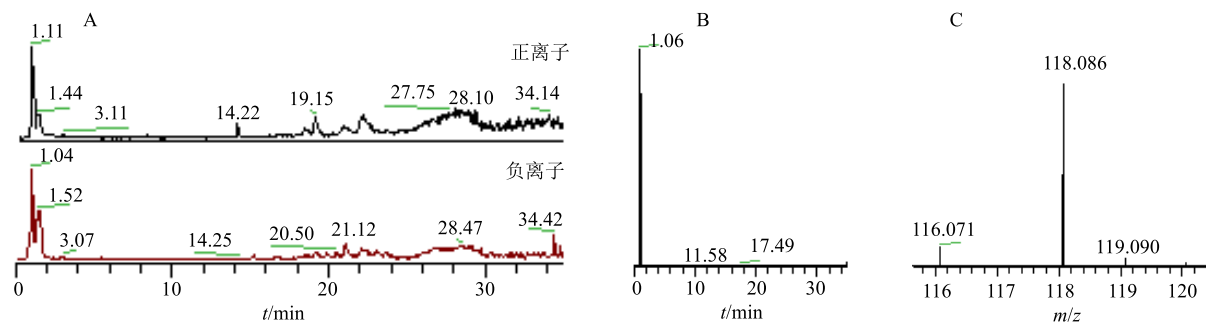
表 2 吴茱萸汤对大鼠异嗜性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Wuzhuyu Decoction effect on rat ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	高岭土摄入量/g	抑制率/%
对照	0.396 5±0.104 6	—
模型	4.638 9±0.925 9*	16.65
吴茱萸汤	2.172 3±0.384 8**	60.45

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

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



A-正、负离子模式下的色谱图 B-正离子模式下 1.06 min 出现的色谱峰 C-正离子模式下 1.01 min 出现的色谱峰所对应的母核离子碎片
A-chromatogram in positive ion mode and negative ion mode B-a chromatographic peak appears at 1.06 min in positive ion mode C-positive ion mode, 1.01 min appeared in peak corresponding to parent ion fragmentation

图 1 全扫描检测大鼠尿液总离子流图及缬氨酸鉴别模式识别

Fig. 1 Full-scan detected urine total ion maps and valine identification pattern recognition in rats

3.4 各组尿液 UPLC-MS 数据模式识别

采用 PLS-DA 和 OPLS-DA 分析方法对对照组、模型组尿液代谢组学数据进行分析, 结果见图 2。通过 PLS-DA 和 OPLS-DA 方法对各组的代谢物差异进行分析, 各组样本尿液的 PLS-DA 得分图和 OPLS-DA 中, 各组的样本点相分离, 且各样本点在一定范围内聚集较好, 说明建模后, 大鼠机体正常的生理代谢被干扰, 从生理代谢物的变化层面也可认为虚寒呕吐模型建立成功。结果显示, 模型的 Q^2 为 0.796、 $R^2_X = 0.912$, $R^2_Y = 0.958$, 即其中 91.7% 的变量被作为用来建立模型的主要成分, 77% 的样本符合模型的判别。

3.5 多元化 ROC 曲线探索性分析

筛查潜在尿液生物标志物代谢组学的临床诊断是一项重要的任务, 在许多研究中, 利用 ROC 曲线评价生物标志物的诊断准确性^[11-12]。0.9 和 0.7 之间的 AUC 代表某种生物标志物的诊断准确性, AUC 大于 0.9 生物标志物具有极高的准确性。ROC 曲线通过使用平衡子采样的蒙特卡罗交叉验证 (MCCV) 生成。在每个 MCCV 中, 2/3 的样本用于评估特征重要性。然后使用前 2, 3, 5, 10...100 (最大) 重要特征来构建分类模型, 其在被省略的样

行分析, 分析结果见图 2, 由 Scores 图可以看出, 各组样本有一定的集聚成群的趋势。再对对照组、模型组、吴茱萸汤组进行 PCA, 结果见图 2-A。由 Scores 图可以看出各组样本有一定的集聚趋势, 说明模型给药刺激后体内代谢物的状态发生了明显改变, 而且这种改变能够通过代谢指纹谱数据聚类的方式表现出来。

品的 1/3 上验证。重复该过程多次以计算每个模型的性能和置信区间。多元化 ROC 曲线分析是基于 3 个多变量算法-支持向量机 (SVM)、PLS-DA 和随机森林分析。该方法广泛应用于医学诊断试验性能的评价。通过改变诊断临界值, 获得样品的灵敏度与特异度值, 以灵敏度为横坐标, (1-特异度) 为纵坐标, 绘制 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积来评价诊断效率。ROC 曲线评价比较模型组与对照组尿液差异性代谢物的精确度和准确性 (图 3)。

通过聚类分析和 PCA 及多元 ROC 曲线探索性分析, 可以发现模型组与对照组有明显的差异。说明建模成功且吴茱萸汤对模型具有一定的干预治疗作用, 这与前期尿液结果相一致。

3.6 尿液中差异代谢物分析

采用“3.3”项方法得到 1 个 30 尿液样本 × 124 变量的数据矩阵。在 PLS-DA 模型中提取 VIP 值最大的前 54 个变量 (VIP 值大于 1.0), 这 54 个变量的载荷矩阵图距原点比较大的距离。通过对目标变量进行手动积分, 并综合 VIP 值、非参数检验和 ROC 曲线的精密度 (>0.5) 来筛选差异代谢物, 确定 34 个变量为代谢标志物。结果见表 3、4。

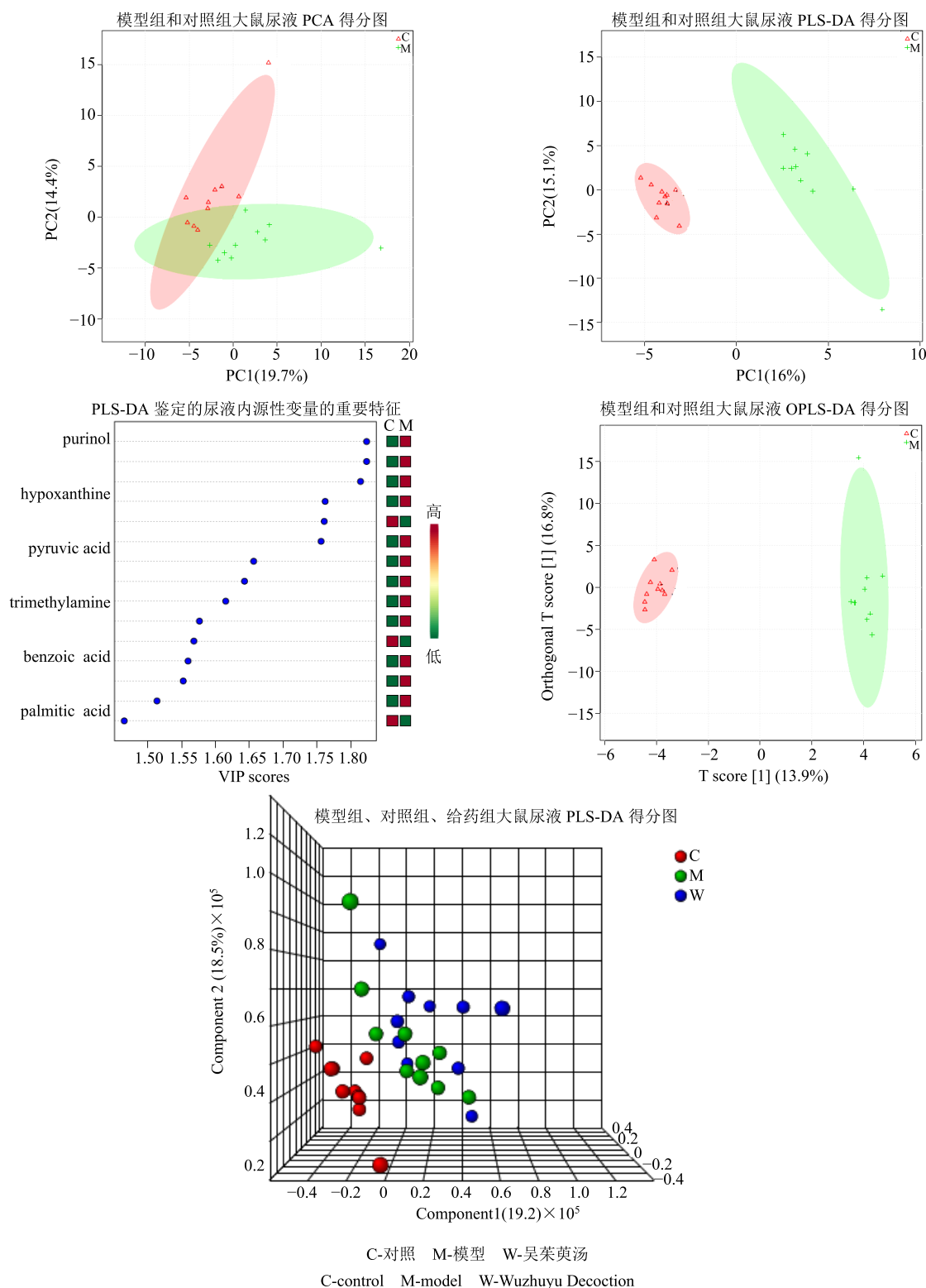


图 2 各组大鼠尿液样本代谢组学分析

Fig. 2 Metabolomics analysis of urine samples from rats in each group

3.7 尿液中差异代谢物的相关代谢通路分析

表 5 和图 4 结果显示了详细的路径分析的结果。Total 表示这个代谢途径中所有代谢物个数；

Hits 表示本研究所筛选的差异代谢物在这个代谢途径中代谢物个数；Raw *P* 表示富集分析的原始计算的 *P* 值；*P* 值(主要目的是抵消多重比较误差)；

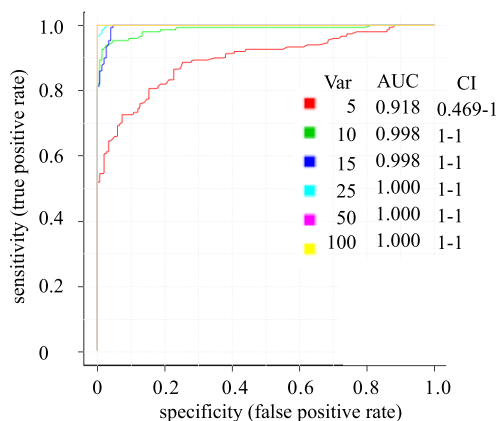


图 3 各组大鼠尿液样本多元化 ROC 曲线分析

Fig. 3 Comparison of urine samples in each group rats from multiple ROC curve analysis

选择代谢通路影响值的临界设置为 0.10，高于这个值认为与潜在的靶标路径关系密切。

采用“3.3”项所用方法对筛选出的尿液差异代谢物构建相关代谢通路由表 3 和图 4 发现，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成，精氨酸和脯氨酸代谢，色氨酸代谢，酪氨酸代谢，花生四烯酸代谢，三羧酸循环（TCA）通路影响值大于 0.10，提示 PLS-DA 所筛选出的差异代谢物与这几个代谢途径有密切的相关性，进一步说明模型、吴茱萸汤治疗作用的发挥与这些代谢途径有关。

3.8 应用相关性分析与分层聚类分析尿液数据结果

3.8.1 尿液差异性代谢物相关性分析结果 尿液中

表 3 归一化处理尿液与虚寒呕吐模型相关的生物标志物的相对含量

Table 3 Potential biomarkers of insufficiency-cold vomiting from comprehensive metabolomic

编号	内源性物质	对照	模型	吴茱萸汤	吴茱萸汤组/对照组	模型组/对照组
1	反式油酸	0.72±0.33	1.34±0.65*	1.45±0.41**	1.86↑	2.01↑
2	2-甲基马尿酸	0.01±0.00	3.71±2.68**	2.57±1.97**	624.90↑	430.66↑
3	甲基戊酸	0.71±0.44	1.82±0.71**	1.79±0.67**	2.56↑	2.51↑
4	4-羟基苯乙酸	4.72±2.50	7.90±2.68*	5.29±1.48	1.67↑	1.12↑
5	富马酸	0.24±0.33	1.36±1.22**	1.42±0.80**	5.68↑	5.92↑
6	异亮氨酸	2.52±1.26	6.63±2.55**	2.68±1.24	2.63↑	1.07↑
7	苯基丙酸	3.87±1.53	2.32±1.09*	3.67±1.26	0.60↓	0.95↓
8	苯甲酸	8.30±4.48	3.48±0.77**	3.80±0.82*	0.42↓	0.46↓
9	高香草酸	2.21±2.53	5.71±5.26*	8.08±7.44*	2.58↑	3.65↑
10	3-甲基组氨酸	0.62±0.58	1.43±1.02*	1.39±0.68*	2.32↑	2.25↑
11	丙氨酸	2.27±2.19	7.69±4.92**	2.56±0.96	3.39↑	1.13↑
12	异柠檬酸	0.98±0.10	7.61±8.10*	9.08±6.64**	7.79↑	9.29↑
13	酪氨酸	0.69±0.78	9.70±1.21*	1.76±1.09*	14.02↑	2.54↑
14	十七酸	1.11±0.91	3.28±1.68*	3.09±1.48**	2.96↑	2.80↑
15	戊酸	0.60±0.35	1.93±1.57**	1.72±1.31*	3.19↑	2.84↑
16	十碳烯酸	1.11±1.03	2.49±1.02*	2.47±1.27*	2.24↑	2.22↑
17	硝基酪氨酸	0.07±0.08	1.10±1.24*	0.14±0.18	15.87↑	2.07↑
18	脯氨酸	0.38±0.16	1.23±1.20*	0.99±0.39**	3.22↑	2.60↑
19	腐胺	2.73±1.18	1.42±0.69*	2.29±1.16	0.52↓	0.84↓
20	葡萄糖酸	2.92±1.23	3.87±0.86*	3.03±0.65	1.33↑	1.04↑
21	亮氨酸	0.31±0.17	1.50±1.55*	0.56±0.22**	4.86↑	1.82↑
22	月桂酸	1.25±1.25	4.06±2.24*	3.54±2.41*	3.25↑	2.83↑
23	十四酸	1.25±0.83	2.34±1.05*	3.74±2.45*	1.87↑	2.99↑
24	棕榈酸	0.15±0.14	3.21±1.83**	3.11±2.70**	21.10↑	20.45↑
25	次黄嘌呤	1.72±0.44	1.28±0.55*	1.49±0.57	0.74↓	0.87↓
26	琥珀酸	3.62±1.94	6.56±2.71*	6.36±1.71**	1.81↑	1.76↑
27	甘露醇	1.01±0.44	2.82±1.02*	1.15±0.91	2.79↑	1.14↑
28	维生素 C	5.26±1.09	3.49±2.25**	5.24±1.13	0.66↓	1.00↑
29	胞嘧啶	0.41±0.32	3.31±2.33**	2.44±1.15**	8.17↑	6.03↑
30	苹果酸	0.34±0.41	2.76±1.39*	2.85±2.37*	8.18↑	8.47↑
31	9-十六碳烯酸	1.50±1.21	4.56±4.12*	4.29±2.41**	3.04↑	2.86↑
32	肌酸	0.44±0.28	3.84±3.56*	0.89±0.31**	8.72↑	2.02↑
33	硫酸吡啶酚	0.55±0.46	1.94±2.03*	1.89±1.29**	35.02↑	34.18↑
34	色氨酸	1.71±1.68	9.04±8.50*	6.99±4.29**	5.28↑	4.08↑

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；↑-上调 ↓-下调* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ↑-up regulated ↓-down regulated

表 4 虚寒呕吐模型相关的生物标志物化学信息

Table 4 Potential biomarkers of insufficiency-cold vomiting

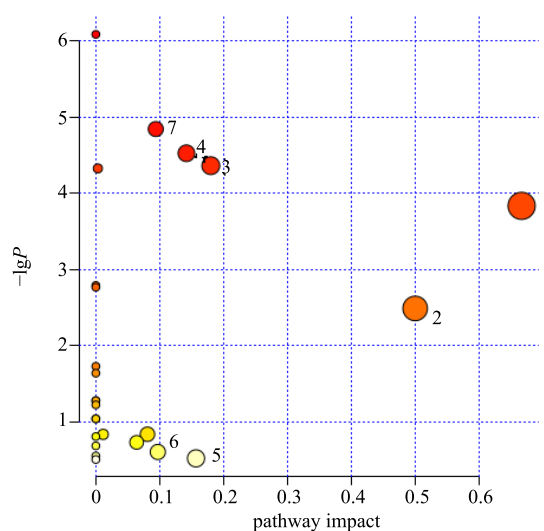
内源性物质	t_R/min	m/z	分子式	KEGG 编号
反式油酸	30.62	282.255 9	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	C01712
2-甲基马尿酸	6.37	193.199 2	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$	C01586
甲基戊酸	2.96	130.141 8	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$	C00671
4-羟基苯乙酸	4.14	152.147 3	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	C00642
富马酸	2.58	116.072 2	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	C00122
异亮氨酸	0.88	131.172 9	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	C00407
苯基丙酸	0.24	165.189 1	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	C00079
苯甲酸	1.19	122.121 3	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	C00180
高香草酸	0.14	182.173 3	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	C05582
3-甲基组氨酸	2.18	169.181 1	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	C01152
丙氨酸	0.81	89.093 2	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	C00041
异柠檬酸	0.81	192.123 5	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	C00311
酪氨酸	1.19	181.188 5	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	C00082
十七酸	31.08	268.434 8	$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C16536
戊酸	24.16	242.397 5	$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$	C16537
十碳烯酸	32.06	282.461 4	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	C00712
硝基酪氨酸	1.19	226.186 1	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$	C03417
脯氨酸	0.91	115.130 5	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	C00148
腐胺	2.25	88.151 5	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$	C00134
葡萄糖酸	0.76	196.155 3	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	C00257
亮氨酸	1.93	131.172 9	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	C00123
月桂酸	27.38	200.317 8	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	C02679
十四酸	18.17	228.370 9	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	C06424
棕榈酸	27.50	256.424 1	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C00249
次黄嘌呤	4.15	136.111 5	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$	C00262
琥珀酸	0.70	118.088 0	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	C00042
甘露醇	28.58	182.171 8	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	C00392
维生素 C	0.81	176.124 1	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	C00072
胞嘧啶	2.65	111.102 0	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$	C00380
苹果酸	0.70	134.087 4	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	C00149
十六碳烯酸	31.83	254.408 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	C08362
肌酸	0.89	131.133 2	$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	C00300
硫酸吡啶酚	7.00	213.2100	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_4\text{S}$	无
色氨酸	6.97	204.225 2	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	C00078

34 个差异性代谢物相关性分析结果见图 5, 图中水平轴和垂直轴均代表内源性物质的变量信息, 颜色越深反映内源性物质的相关性越强, 颜色越浅反映相关性越弱, 棕红色表示正相关, 绿色表示负相关, 因此, 根据图 5 可以清晰地看出差异性内源性代谢

表 5 构建分析通路结果 (Impact>0.10)

Table 5 Result from pathway analysis with MetPA (Impact > 0.10)

编号	代谢通路	Total	Hits	Raw P
1	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	11	2	0.021 601 0
2	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	4	1	0.082 970 0
3	精氨酸与脯氨酸代谢	44	4	0.012 754 0
4	色氨酸代谢	41	1	0.593 380 0
5	酪氨酸代谢	42	4	0.010 835 0
6	花生四烯酸代谢	36	1	0.545 560 0
7	TCA 循环	20	3	0.007 888 6



图中数字编号与表 5 中编号一致

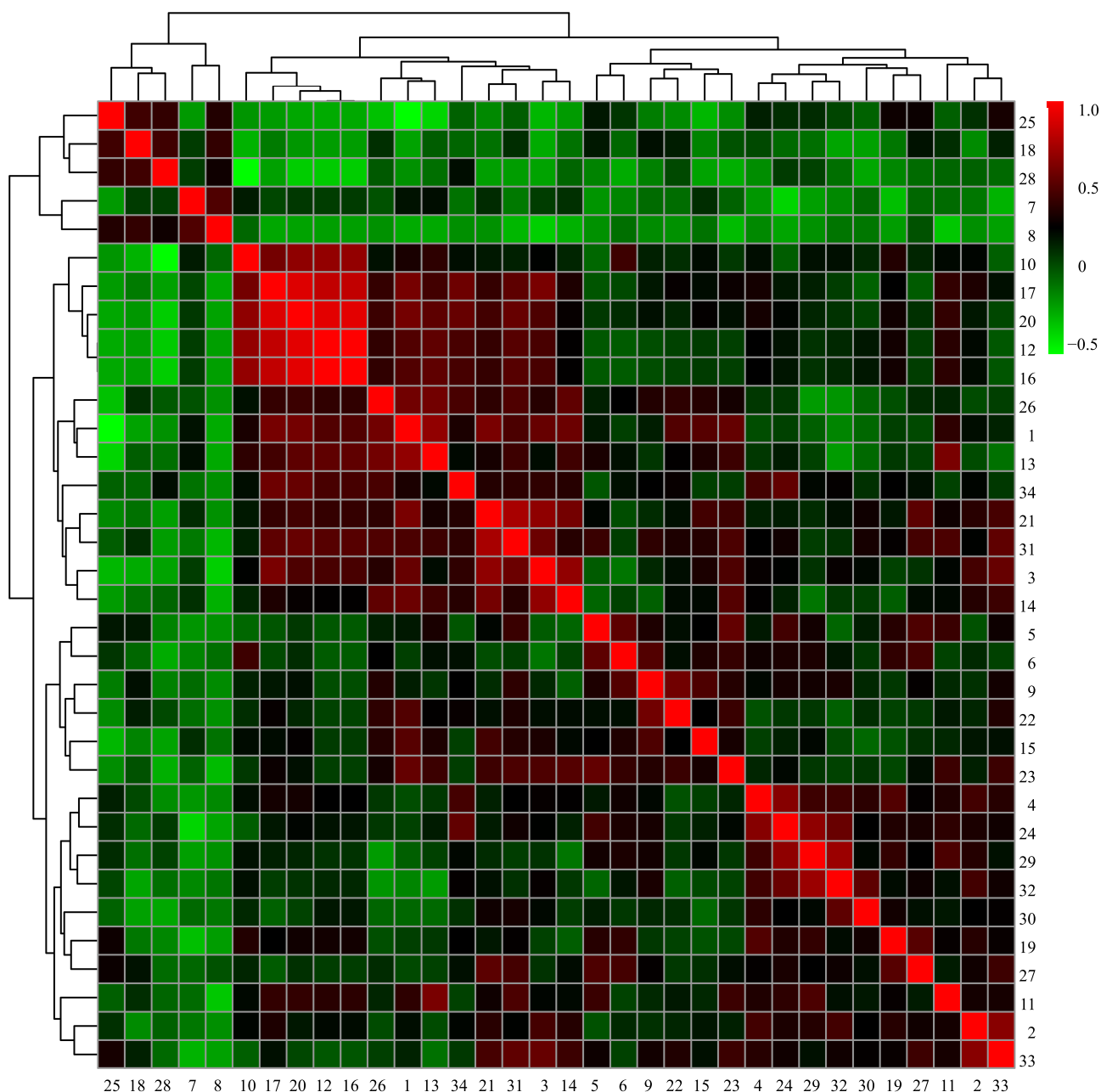
Number in figure is the same as number in table 5

图 4 使用 MetPA 数据库构建重要内源性小分子相关代谢通路

Fig. 4 Pathway analysis summary diagram of main endogenous small molecules obtained by MetPA

物之间的相关性。从横轴看, 在同一小分支下的内源性物质, 它们的正相关性最强, 即某一个内源性代谢产物含量升高或者降低, 则与之相关性强的内源性物质会随之升高或降低。

3.8.2 尿液分层聚类分析结果 分层聚类分析获得的热图 (图 6), 其可直观显示出 34 种尿液代谢物在各组间的含量变化趋势。图中水平轴和垂直轴分别代表样品与变量信息, 从第 1 行可以看出各组基本分开。颜色深浅反映变量值大小, 棕色表示含量最高, 绿色表示含量最低, 垂直轴中的分叉越近说明相似度越高。从图中可以看出, 对照组与其他各



图中数字编号与表 3 中编号一致

Number in figure is the same as number in table 3

图 5 热图分析重要内源性物质相关性 (使用欧几里德的距离度量和 ward.D 聚类算法)

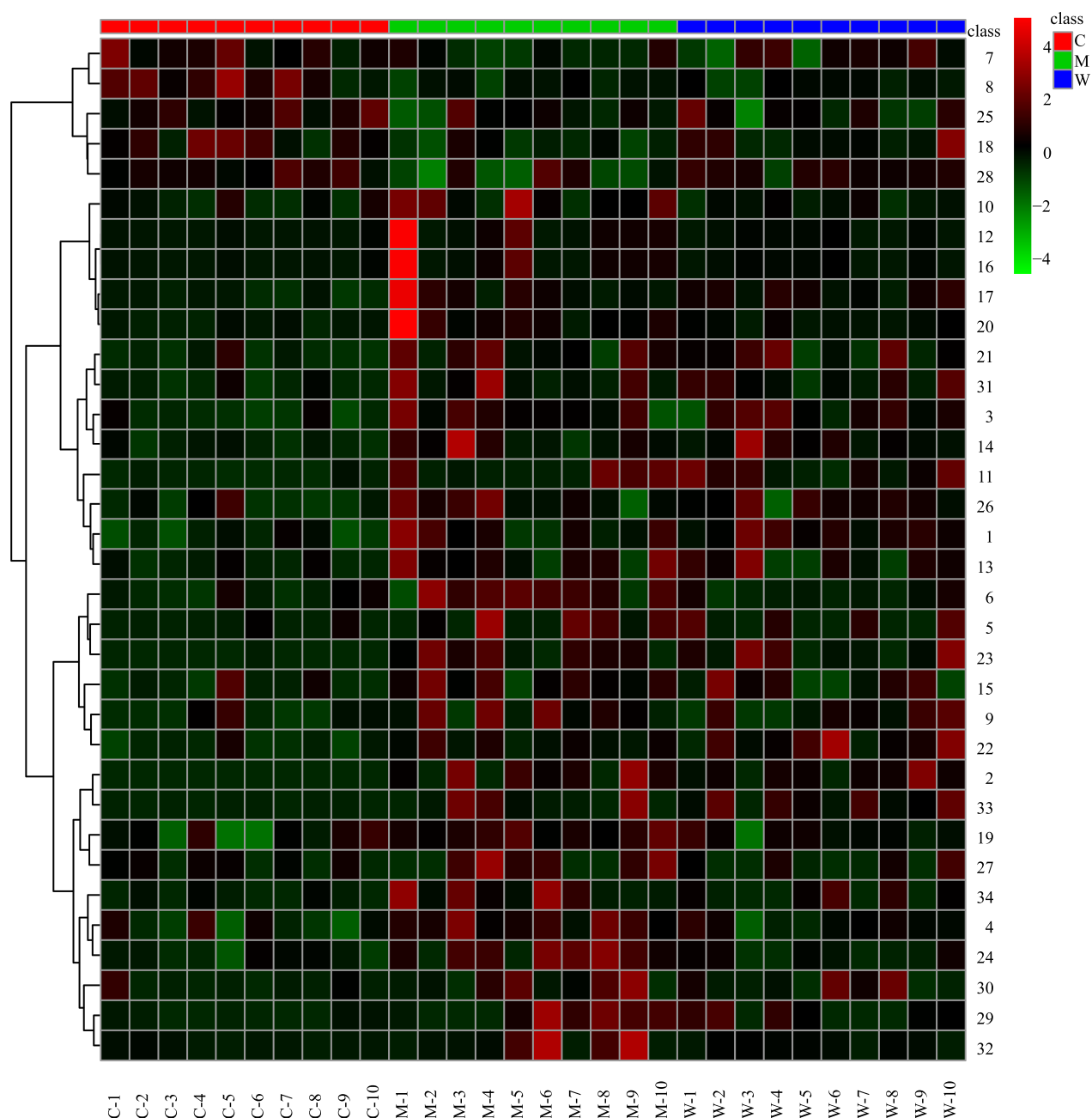
Fig. 5 Clustering result of main endogenous materials shown as heatmap (distance measure using euclidean, and clustering algorithm using ward.D)

组显著分开, 各组大部分不在一个分支下面, 其中吴茱萸汤与对照组最接近, 说明吴茱萸汤对模型机体具有调节作用, 这与血清结果相一致。

3.9 吴茱萸汤尿液代谢组学网络构建及分析

已研究表明疾病或生理过程是一个复杂的网络现象^[13-14]。利用代谢网络构建吴茱萸汤发挥温脾止呕作用的潜在生物标志物, 进一步阐释其分子作用机制。利用 Metscape 和 Ctosape 软件分析富集相关

代谢途径和进一步构建与其药效相关的复合网络。Cytoscape 被用于可视化网络图上的差分统计输出。所有的网络图被导入到 Cytoscape^[15]在 124 个代谢物中, 与对照组相比, 模型组和吴茱萸汤组均与之存在差异。代谢途径是细胞内发生一系列化学变化, 每一途径主要体现生物机体的某些功能, 每个小网络模块代表其发挥药效的功能单元, 寻找潜在的生物标志物是代谢网络的一大特点, 模块越复



图中数字编号与表 3 中编号一致

Number in figure is the same as number in table 3

图 6 分层聚类分析各组大鼠尿液内源性物质相关性 (使用欧几里德的距离度量和 ward.D 聚类算法)

Fig. 6 Clustering result of endogenous materials of rats urine samples shown as heatmap (distance measure using euclidean, and clustering algorithm using ward.D)

杂, 网络规模越完善^[16-17]。根据两组之间内源性物质的相关性, 描绘了内源性物质之间的内在联系及内源性物质的变化。客观分析吴茱萸汤温脾止呕的作用机制。研究表明, 吴茱萸汤组和模型组在大鼠尿液内源性物质上存在网络差异, 构建的网络代谢通路图有利于深入探讨药物发生药效的分子靶点, 有利于解释

中药复方的作用机制而不丢失其重要信息。

网路中的模块具有相似性, 通过跨模块化连接到网路中的相邻的模块中各个模块的节点, 从而导致模块边缘之间的重叠。网络模型可以表达网络药物, 目标和疾病之间复杂的关系; 节点代表实体如基因、蛋白质、小分子、药物、疾病; 连线代表节

着重要的作用^[22]。亮氨酸还是调节骨骼肌与心肌蛋白质运转的唯一氨基酸。中医认为,虚寒表现为运化失司,精微物质来源不足,肌无所养,从而出现乏力、消瘦等,这些症状与尿液中异亮氨酸、色氨酸、脯氨酸、肌酸、亮氨酸的丢失过多,导致营养不良可能有一定联系。苯丙氨酸通过去羟基合成酪氨酸,苯丙氨酸减少,4-羟基苯乙酸、酪氨酸增加,提示机体苯丙氨酸和酪氨酸代谢异常,导致神经调节紊乱。酪氨酸与多巴胺的合成有关,提示吴茱萸汤止呕的作用机制与苯丙氨酸和酪氨酸代谢异常有关。色氨酸作为生物体必须氨基酸之一,是蛋白质生物合成中的基础氨基酸,且生物体本身不能合成,需要从食物中摄取以满足自身的需要,在维持氮平衡、肌肉质量和体重等方面具有重要的作用,它还参与多条代谢通路,是神经递质 5-HT 合成的前体^[23-24],色氨酸是一种神经递质。本研究中与对照组相比,吴茱萸汤组中 5-羟色胺、氧化三甲胺含量升高;亮氨酸、天冬氨酸、脯氨酸含量降低。这与 Wang 等^[25]通过利血平诱导的小鼠抑郁症模型研究左金丸乙醇提取物抗抑郁机制,结果显示左金丸乙醇提取物显著增加小鼠海马区中单胺类神经递质多巴胺与去甲肾上腺素的水平,纹状体中去甲肾上腺素、多巴胺及 5-羟色胺这 3 种物质水平也显著增加相一致。而 5-羟色胺、多巴胺、亮氨酸、胆碱等神经递质的释放均可导致呕吐反应,与胆碱代谢紊乱相关。可能虚寒呕吐模型大鼠饮水量下降,异嗜高岭土量增加,免疫力下降及氨基酸代谢紊乱引起机体氨基酸代谢及神经递质代谢发生紊乱有关。

3.10.2 脂类代谢 脂类代谢包括脂肪酸生物合成、脂肪酸伸长、脂肪酸降解、酮的合成和类固醇生物合成、花生四烯酸代谢、初级胆汁酸合成等多种途径。脂肪酸(比如二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸被认为可以减少炎症类花生酸(前列腺素和白三烯、细胞因子和活性氧自由基的生成),以及黏附分子的表达,所以多不饱和脂肪酸的抗炎反应功能可以改善细菌激活的巨噬细胞诱导的炎症反应因子^[26-30]。本实验研究发现反式油酸、苯甲酸、十七烷酸、十五烷酸、十八烯酸、月桂酸、十四烷酸、棕榈酸、2-甲基马尿酸、高香草酸、富马酸是尿液差异性代谢产物。其中,与对照组相比,反式油酸、苯甲酸、十七烷酸、十五烷酸、十八烯酸、月桂酸、十四烷酸、2-甲基马尿酸、高香草酸、富马酸含量升

高;棕榈酸含量降低,说明机体脂质代谢发生紊乱,且吴茱萸汤对其具有一定的干预调节作用。

3.10.3 柠檬酸代谢 异柠檬酸是 TCA 的中间产物,TCA 是机体获得能量的主要方式之一,在线粒体内发生,受线粒体功能及体内能量产生、利用的影响。TCA 作为物质代谢的总枢纽,是三大营养素的最终代谢通路,糖、脂肪、氨基酸在体内进行生物氧化都将产生乙酰辅酶 A,然后进入 TCA 进行降解。本实验研究发现与对照组相比,模型组中异柠檬酸、琥珀酸、苹果酸含量减少,说明机体 TCA 受阻,导致异柠檬酸、琥珀酸、苹果酸在尿液中的含量升高。

4 结论

本实验研究发现反式油酸、2-甲基马尿酸、甲基戊酸、4-羟基苯乙酸、富马酸、异亮氨酸、L-苯丙氨酸、苯甲酸、高香草酸、3-甲基组氨酸、异柠檬酸、酪氨酸、十七烷酸、十五烷酸、十八烯酸、硝基酪氨酸、脯氨酸、腐胺、葡萄糖酸、亮氨酸、月桂酸、十四烷酸、棕榈酸、琥珀酸、甘露醇、维生素 C、胞嘧啶、苹果酸、次黄嘌呤、棕榈油酸、肌酸、吡啶硫酸、色氨酸为虚寒呕吐大鼠尿液的差异性代谢产物。吴茱萸汤对虚寒呕吐模型发挥治疗作用可能与调节谷氨酰胺和谷氨酸代谢、亚油酸代谢色氨酸代谢、酪氨酸代谢、花生四烯酸代谢等通路有关,另外,网络模块自身的相似性和重叠性间接证明对其模型大鼠具有恢复作用。

参考文献

- [1] 肖 迅,杨 燕,张 红,等.金钗石斛提取物对家鸽呕吐模型及家兔浆膜胃电活动的影响[J].中药材,2016,39(8):1885-1887.
- [2] 王 冰.重广补注黄帝内经素问[M].北京:学苑出版社,2008.
- [3] 张 婷.方剂辨证论治方法体系之建立[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [4] 潘守杰,殷常春,丰育来.吴茱萸汤治疗晚期胃癌呕吐 32 例临床观察[J].辽宁中医杂志,2009,36(9):1519-1520.
- [5] 李文兰,姬海南,王朋倩,等.虚寒呕吐模型的复制和吴茱萸汤的止呕作用研究[J].中华中医药学刊,2017,35(5):1066-1069.
- [6] 姬海南,杜新亮,孟 晶.高效液相色谱法同时测定吴茱萸汤中 5 种活性成分的含量[J].中南药学,2017,15(1):92-95.
- [7] Wishart D S, Tzur D, Knox C. HMDB: The human

- metabolome database [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(7): 521-526.
- [8] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [9] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucl Acids Res*, 2008, 36(1): 480-484.
- [10] Steuer R, Kurths J, Fiehn O. Observing and interpreting correlations in metabolomic networks [J]. *Bioinformatic*, 2003, 19(8): 1019-1026.
- [11] Wu H, Xue R, Tang Z. Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(4): 1385-1395.
- [12] Li Y, Song X, Zhao X. Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2014, 966(1): 47-53.
- [13] Hornberg J J, Bruggeman F J, Westerhoff H V. Cancer: A systems biology disease [J]. *Biosystems*, 2006, 83(2/3): 81-90.
- [14] Szabadkai G, Rizzuto R. Chaperones as parts of cellular networks [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 594(1): 64-77.
- [15] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [16] De La Fuente I M, Martínez L, Pérez-Samartín A L. Global self-organization of the cellular metabolic structure [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e331.
- [17] Ma W, Trusina A, El-Samad H L. Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 760-773.
- [18] 陈 斌, 王伟明, 黄育华. 柴胡疏肝散对肝气郁结证大鼠尿液代谢组学的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(5): 297-300.
- [19] 余成浩, 张 宏, 余葱葱. 论中医动物模型的研究思路与方法 [J]. 中药药理与临床. 2007, 23(5): 233-235.
- [20] Yuen K C, Biller B M, Molitch M E. Clinical review: Is lack of recombinant growth hormone (GH)-releasing hormone in the United States a setback or time to consider glucagon testing for adult GH deficiency? [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8): 2702-2707.
- [21] 史仍飞, 袁海平. 支链氨基酸代谢与运动 [J]. 上海体育学院学报, 2003, 27(5): 65-67.
- [22] Han X, Patters A B, Jones D P. The taurine transporter: Mechanisms of regulation [J]. *Acta Physiol*, 2006, 187(2): 61-73.
- [23] 刘树明, 卢 芳, 董培亮. 基于代谢组学整体表征中药药性及性效关系 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(6): 1-5.
- [24] Pawlak D, Takada Y, Urano T. Serotonergic and kynurenic pathways in rats exposed to foot shock [J]. *Brain Res Bull*, 2000, 52(3): 197-205.
- [25] Wang Q S, Ding S L, Mao H P, et al. Antidepressant-like effect of ethanol extract from Zuojin Pill, containing two herbal drugs of *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Evodiae*, is explained by modulating the monoaminergic neurotransmitter system in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 603-609.
- [26] Kure L, Nishiumi S, Nishitani Y. Lipoxin A4 reduces lipopolysaccharide induced inflammation in macrophages and intestinal epithelial cells through inhibition of nuclear factor kappa B activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(2): 541-548.
- [27] Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease [J]. *Reprod Nutr Dev*, 2004, 44(3): 273-282.
- [28] Wall R, Ross R P, Fitzgerald G F, et al. Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids [J]. *Nutr Rev*, 2010, 68(5): 280-289.
- [29] Sato S, Nomura F, Kawai T. Synergy and cross tolerance between toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated signaling pathways [J]. *J Immunol*, 2000, 165(12): 7096-7101.
- [30] Kirkwood T B, Kowald A. Network theory of aging [J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(4/5): 395-399.