

基于粪便代谢组学技术的逍遥散抗抑郁作用机制研究

吕 梦^{1,2}, 王雅泽^{1,2}, 赵 迪^{1,2}, 赵思俊³, 李顺勇⁴, 秦雪梅^{1,2*}, 刘晓节^{1,2*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 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

3. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

4. 山西大学数学科学学院, 山西 太原 030006

摘要:目的 应用核磁共振氢谱(¹H-NMR)代谢组学技术研究慢性温和不可预知应激(CUMS)抑郁大鼠粪便中内源性代谢物及代谢通路的变化,并评价逍遥散的改善作用,探讨其抗抑郁作用机制。方法 使用CUMS造模程序建立抑郁模型,采用¹H-NMR技术结合多变量统计分析方法,研究CUMS抑郁大鼠粪便代谢物谱的变化、鉴定相关代谢标志物并构建代谢通路。结果 在抑郁大鼠粪便样本中共筛选10种与抑郁相关的潜在生物标志物。与对照组比较,模型组天冬酰胺、天冬氨酸、乳酸和丙酸水平显著升高($P < 0.05, 0.01$),而苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸和脯氨酸水平显著降低($P < 0.05, 0.01$)。与模型组相比,逍遥散能显著升高苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸的水平,能显著降低天冬酰胺、乳酸和丙酸的水平。与对照组比较,CUMS抑郁大鼠粪便中6条代谢通路发生了显著变化:包括(1)氨基酰 tRNA 生物合成,(2)丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,(3)精氨酸和脯氨酸代谢,(4)谷氨酸和谷氨酰胺代谢,(5)苯丙氨酸代谢以及(6)丙酮酸代谢。而逍遥散可显著回调(2)、(3)、(4)、(5)和(6)条代谢通路。结论 逍遥散可能通过调控氨基酸代谢、糖代谢和肠道微生物的代谢等途径发挥抗抑郁作用。

关键词: 逍遥散; 抑郁症; 粪便代谢组学; 慢性温和不可预知应激抑郁模型; ¹H-NMR; 肠道微生物

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)13-3482-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.016

Anti-depression mechanisms of Xiaoyao Powder based on fecal metabolomics

LV Meng^{1,2}, WANG Ya-ze^{1,2}, ZHAO Di^{1,2}, ZHAO Si-jun³, LI Shun-yong⁴, QIN Xue-mei^{1,2}, LIU Xiao-jie^{1,2}

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

2. Shanxi Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

4. School of Mathematics Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To characterize the endogenous metabolites and metabolic changes of feces of chronic unpredictable mild stress (CUMS) rats by ¹H-NMR, evaluate the improvement effects of Xiaoyao Powder and investigate the underlying mechanisms. **Methods** The depression model was established by CUMS procedure. ¹H-NMR coupled with multivariate statistical analysis was employed to reveal the changes of fecal metabolic profiles of CUMS rats and identify potential bio-markers involved in CUMS-induced depression. Based on the potential bio-markers, the relevant metabolic pathways were constructed. **Results** A total of 10 metabolites was identified as potential bio-markers in fecal samples for the CUMS model. Compared with the control group, the contents of asparagine, aspartate, lactate and propionic acid in the CUMS rats were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while phenylalanine, tyrosine, glutamate, glutamine, alanine and proline were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The administration of Xiaoyao Powder could significantly increase the levels of phenylalanine, tyrosine, glutamate, glutamine and proline, whereas reduced the levels of asparagine, lactate and propionic acid. Compared with the control group, six metabolic pathways were recognized as the most influenced pathways

收稿日期: 2019-12-15

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81803962)

作者简介: 吕 梦(1992—), 女, 硕士研究生。Tel: (0351)7018379 E-mail: balancelm1980@163.com

*通信作者 刘晓节, 女, 硕士生导师, 研究方向为经典复方配伍规律研究。Tel: (0351)7018379 E-mail: liuxiaojie@sxu.edu.cn

秦雪梅, 女, 博士生导师, 研究方向为抗抑郁中药新药研发。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

associated with the CUMS-induced depression: (1) aminoacyl-tRNA biosynthesis, (2) alanine, aspartate and glutamate metabolism, (3) arginine and proline metabolism, (4) glutamine and glutamate metabolism, (5) phenylalanine metabolism and (6) pyruvate metabolism. Among them, Xiaoyao Powder significantly mediated abnormalities of five pathways of (2), (3), (4), (5) and (6). **Conclusion** It is the first report to investigate the antidepressant-like effects and underlying mechanisms of Xiaoyao Powder from the perspective of fecal metabolites. The current results showed that the anti-depression mechanisms of Xiaoyao Powder might be related to regulating the amino acid metabolism, glucose metabolism and intestinal microbial metabolism. This study provides a solid basis for revealing the anti-depression mechanisms of Xiaoyao Powder comprehensively and deeply.

Key words: Xiaoyao Powder; depression; fecal metabolomics; chronic unpredicted mild stress model; $^1\text{H-NMR}$; intestinal microbial

抑郁症是一种以明显而持久的心情低落为主的精神障碍性疾病,具有高发病率、高复发率、高致残率的特点^[1],严重危害人类身心健康,给社会和家庭带来沉重负担。WHO 预测到 2030 年抑郁症将成为全球疾病负担的主要原因^[2]。目前治疗抑郁症的化学药以选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、5-羟色胺/去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)等为主。但这些药物具有不良反应和副作用较多、患者依从性较差等问题。中药因其多途径、多靶点、多层次的治疗特点以及副作用小、能改善伴发症状等优势,在抑郁症的治疗上受到越来越多的关注。

经典名方逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、薄荷等 8 味药组成。临床研究及现代药理研究均表明逍遥散治疗抑郁症疗效确切^[3-4],但其抗抑郁作用机制仍有待深入研究。

代谢组学是 20 世纪 90 年代末期发展起来的一门新兴学科,是研究关于生物体系受刺激或干扰后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物(内源性代谢物质)种类、数量及其随时间变化规律的科学,代谢组学分析技术具有高通量、高灵敏度、高精确度的特点,其所研究的内源性小分子代谢物能够直接准确地反映生物体的病理生理状态^[5]。代谢组学的研究思路与中医药的整体观和系统观不谋而合,已被广泛用于中药及其复方的药效评价、毒性研究、作用机制探索等领域^[6-8]。

粪便中的代谢物是肠道菌群和宿主共同代谢的产物。与其他生物样本相比,粪便是一种绝对无创的生物样本,能够整体反映疾病条件下的代谢状况^[9-11]。因此,作为研究机体代谢的一个重要方面,粪便代谢的研究将为探讨疾病发病机制、增强临床诊断的客观性、研究药物药效作用及机制提供重要信息。

本研究以逍遥散为研究对象,应用核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)代谢组学技术结合多元统计方法,分析慢性温和不可预知应激(CUMS)抑郁模型大鼠

粪便中内源性代谢物及代谢通路的变化以及逍遥散的改善作用,从粪便代谢组学角度探讨逍遥散抗抑郁作用机制。同时,研究结果将为进一步深入研究抑郁症、肠道菌群和中药三者之间的关系奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠,SPF 级,雄性,体质量 180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006。将大鼠置于室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%~55%和光/暗周期为 12 h/12 h 的动物房里适应性饲养 1 周,自由进食实验室标准饲料和自来水。

1.2 药物与试剂

逍遥散方出自《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜组成。组方药材均购于山西省和仁堂中药饮片有限公司,经山西大学中医药现代研究中心主任秦雪梅教授鉴定,均为《中国药典》2015 年版收载的正品药材:柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.、茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq.、生姜 *Zingiber officinale* Rosc.; 盐酸文拉法辛胶囊(博乐欣, 25 mg/粒)购自成都康弘药业集团股份有限公司(批号 180902); 蔗糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)干粉购于山西百奥生物技术有限公司; NMR 试剂重水(D_2O)和 3-(三甲基硅基)氘代丙酸钠-2,2,3,3- D_4 (TMSP)均购自美国 Cambridge Isotope Laboratories Inc.公司。

1.3 仪器

Bruker 600-MHz AVANCE III 核磁共振检测仪(德国布鲁克公司);代谢笼(苏州实验动物笼具厂);LD500-1 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);CP214 电子天平(奥豪斯仪器常州有限公司);CPA225D 电

子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 101 系列恒温干燥箱(北京和同创业科技有限责任公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); 大鼠旷场测试箱(长 100 cm、宽 100 cm、高 80 cm), 黑色, 25 格, 实验室自制; KG5200E 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 逍遥散水煎剂的制备

逍遥散水煎剂制备方法参考文献方法^[12-13], 按逍遥散各药材(柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜质量比 6:6:6:6:3:2:2)配比称取药材, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h, 水煎提取 2 h, 收集水煎液, 再用 8 倍体积水提取 2 h, 合并 2 次水煎液, 减压浓缩至稠浸膏, 红外干燥得干浸膏[含芍药苷(1.12 ± 0.37) mg/g] 备用, 用时折算成生药量进行配制。

2.2 动物分组及给药

大鼠适应性饲养期间进行旷场实验和糖水训练, 根据体质量和旷场实验结果将大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 即对照组、模型组、逍遥散水煎剂组(46.3 g/kg)和阳性对照文拉法辛组(0.035 g/kg)。课题组前期研究结果显示, 逍遥散抗抑郁最佳生药量剂量为 46.3 g/kg, 因此, 本研究逍遥散的给药剂量依据课题组前期结果^[14]设置为 46.3 g/kg。除对照组外, 其余各组均单笼饲养并实施造模程序, 造模时间为 28 d。造模开始后 ig 给药, 药物组给予相应浓度药液, 模型组及对照组给予等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 4 周。

2.3 CUMS 模型的制备

CUMS 模型被认为是目前最有效的动物抑郁症模型, 在研究抑郁症发病机制及抗抑郁药物的作用机制方面具有很大的优越性。课题组前期参考 Willner 等^[15]方法, 成功复制了 CUMS 抑郁模型并形成了一套规范的标准化造模方法, 可复制出稳定性高的抑郁动物模型^[16]。CUMS 模型的建立包括 9 种不同的刺激: 50 °C 热刺激(10 min)、4 °C 冰水浴(5 min)、超声刺激(3 h)、夹尾(2 min)、昼夜紊乱、足底电击(电压 36 V, 每隔 10 s 刺激 1 次, 共 10 次)、禁水(24 h)、束缚(3 h)、禁食(24 h), 每日随机给予 1 种刺激, 同种刺激不连续出现, 出现总次数不超过 4 次, 持续 28 d。所有组别大鼠每周均进行称体质量、糖水偏爱率和旷场实验测试。造模与给药同时进行。

2.4 粪便样品收集

所有受试大鼠于造模过程第 28 天置于代谢笼中, 自由饮水, 收集 12 h 内的粪便。粪便样本保存于-80 °C, 待测。

2.5 ¹H-NMR 代谢组学研究

2.5.1 粪便提取及预处理 称取粪便 100 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 000 μ L PBS (0.1 mol/L, pH 7.4), 涡旋充分混匀后用液氮反复冻融 3 次。冻融物混匀后冰浴超声 20 s, 静置 40 s, 重复 20 次, 离心(13 000 $\times$ g, 15 min, 4 °C)。取 500 μ L 上清液, 加入 100 μ L 含有 0.002 5% (质量体积比) TMS 的 D₂O, 混匀, 转移至 5 mm NMR 测试管中, 待测。

2.5.2 ¹H-NMR 分析 样品在 Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 仪上检测。采用 1D CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列, 检测谱宽 12 019.2 kHz, 扫描次数为 64 次, FID 分辨率 0.183 Hz, 采样时间 2.726 3 s, 延迟时间 1.0 s, 采样间隔 41.6 s, 采样点为 65 536。

2.5.3 ¹H-NMR 谱图处理及数据分析 采用 MestReNova 核磁图谱数据处理软件 (Mestrelab Research, Santiagode Compostella, 西班牙) 对粪便 ¹H-NMR 图谱进行傅里叶转换, 然后进行相位、基线的调整, 以 TSP 的化学位移(δ 0.0)为标准对谱图进行化学位移的定标。切除 δ 4.70~5.00 区间的水峰, 以 0.01 为单位对 δ 0.60~9.00 的核磁图谱做等宽度分割进行分段积分, 并对数据进行归一化处理。将上述数据保存在 Excel 表格中, 用于多元统计分析。

采用 SIMCA-P 13.0 软件(Umetrics 公司, 瑞典)对积分数据进行多元统计分析。主成分分析(PCA)反映样品整体的分布趋势, 同时可以观察到组内有无异常点, 分析结果以得分图(Scores plots)显示。归一化数据经单位方差换算(UV)标度化处理后, 进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。其中, PLS-DA 用于分析 NMR 数据与分组变量之间的关系, OPLS-DA 最大化凸显组别之间的差异。同时得到变量投影重要性(variable importance in the projection, VIP)>1 的代谢物信息。参数 R^2 和 Q^2 分别表示模型拟合情况和预测能力。

2.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计学软件 Graphpad Prism 7.0 进行统计分析, 通过单因素方差分析和配对 t 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 大鼠行为学指标观察

造模之前,模型组和对照组大鼠的体质量、糖水偏爱率、旷场实验得分(穿越格数、直立次数)差异均无显著性(表 1)。造模第 28 天,与对照组比较,模型组大鼠体质量显著下降($P<0.05$),糖水偏爱率显著降低($P<0.05$),旷场实验中的直立次数和穿越格数均显著减少($P<0.05$)。结果表明,CUMS 大鼠抑郁模型复制成功。

与模型组相比,文拉法辛组和逍遥散组大鼠给药 4 周后体质量和糖水偏爱率均显著提高($P<0.05$ 、 0.01)。旷场试验中,文拉法辛组能显著提高模型大鼠的直立次数($P<0.05$),逍遥散组有提高趋势($P>$

0.05);文拉法辛组和逍遥散组能增加抑郁大鼠的穿越格数,但无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

3.2 大鼠粪便 $^1\text{H-NMR}$ 图谱指认与归属

通过分析每个化合物的化学位移、偶合常数及峰形等信息,结合文献报道并参照 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库对本实验图谱进行指认,共鉴定 24 种化合物(图 1),其化学位移及谱峰归属见表 2。这些化合物可归纳为有机酸(乳酸、醋酸、尿囊酸、延胡索酸)、氨基酸(异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脯氨酸、赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、苯丙氨酸)、脂肪酸(丁酸、丙酸)、有机碱(尿嘧啶)和其他类(胆汁酸、氧化三甲胺、次黄嘌呤)等。

表 1 各组大鼠体质量、糖水偏爱和旷场实验得分结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Body weight, sucrose preference and scores in open-field tests of control and depressed rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体质量/g		糖水偏爱率/%		直立次数		穿越格数	
	造模前	造模后	造模前	造模后	造模前	造模后	造模前	造模后
对照	235.70 $\pm$ 2.08	355.60 $\pm$ 18.04	76.59 $\pm$ 5.77	82.17 $\pm$ 5.49	15.83 $\pm$ 3.19	9.00 $\pm$ 2.61	92.17 $\pm$ 11.75	40.83 $\pm$ 19.62
模型	238.90 $\pm$ 5.06	335.10 $\pm$ 13.28*	74.07 $\pm$ 7.47	63.29 $\pm$ 19.15*	15.00 $\pm$ 4.10	1.67 $\pm$ 1.51*	84.50 $\pm$ 12.83	5.14 $\pm$ 5.49*
逍遥散	237.40 $\pm$ 7.11	364.30 $\pm$ 13.37##	78.64 $\pm$ 7.73	82.50 $\pm$ 6.25#	12.33 $\pm$ 3.33	3.83 $\pm$ 4.12	99.33 $\pm$ 7.12	24.50 $\pm$ 33.55
文拉法辛	234.80 $\pm$ 8.54	368.10 $\pm$ 11.11##	77.72 $\pm$ 12.17	82.33 $\pm$ 3.01#	13.67 $\pm$ 2.50	8.83 $\pm$ 7.89#	91.17 $\pm$ 6.56	22.00 $\pm$ 19.79

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

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

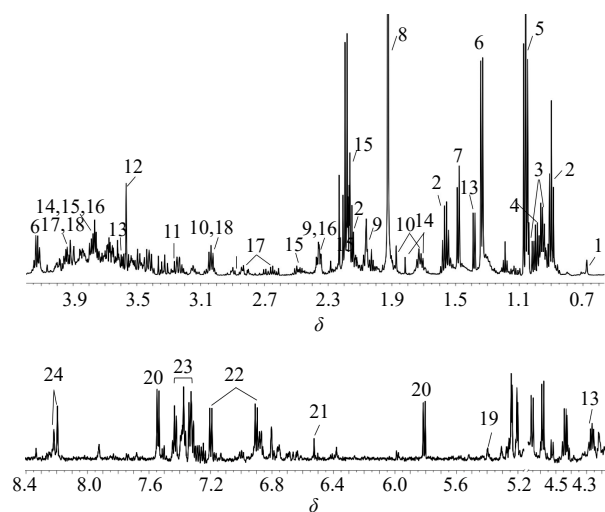


图 1 对照组大鼠粪便样本 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 1 Typical $^1\text{H-NMR}$ spectrum of fecal samples collected from rats of control group

3.3 CUMS 抑郁大鼠粪便代谢轮廓的变化

采用无监督的 PCA 对所有大鼠粪便样本的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢轮廓进行分析,结果见图 2-A。PCA 结果表明,对照组与模型组可以完全区分开,说明 CUMS 抑郁大鼠的机体生理和代谢状态发生了明显

的变化。进一步采用 PLS-DA 模式识别方法进行分析,结果见图 2-B、C。PLS-DA 散点图(图 2-B)显示对照组与模型组的散点能够明显区分,验证了 PCA 的分析结果,表明 CUMS 大鼠模型复制成功。模型验证结果显示左侧所有 R^2 和 Q^2 值低于右侧原始点或 Q^2 的回归线与纵轴相交数值小于零,表明所建的模型具有较高的可靠性(图 2-C)。

3.4 与 CUMS 抑郁相关的粪便差异代谢物的筛选

为进一步确定 CUMS 造模前后大鼠粪便中内源性代谢产物的差异,最大化组间分离,筛选与 CUMS 抑郁高度相关的差异代谢物,采用 OPLS-DA 对样品进行分析,并绘制 OPLS-DA 得分图(图 3-A)和相应的 S-plot 载荷图(图 3-B,模型参数: $R^2_X=0.648$, $R^2_Y=0.992$, $Q^2=0.853$)。通过 S-plot 图结合 VIP 值(>1),独立样本 t 检验 $P<0.05$ 寻找差异代谢物,共得到 10 个峰面积具有显著性差异的代谢物。与对照组比较,模型组天冬酰胺($P<0.01$)、天冬氨酸($P<0.05$)、乳酸($P<0.01$)和丙酸($P<0.01$)水平显著升高,而苯丙氨酸($P<0.01$)、酪氨酸($P<0.01$)、谷氨酸($P<0.01$)、谷氨酰胺($P<0.01$)、丙氨酸($P<0.05$)和脯氨酸($P<0.01$)水平显著降低(图 4)。

表 2 大鼠粪便 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中主要代谢物峰归属Table 2 Peak attribution in $^1\text{H-NMR}$ spectra in faeces of rats

峰号	代谢物	基团	δ_{H}
1	胆汁酸	C-18 axial methyl	0.70 (m)
2	丁酸	CH_3 , $\beta\text{-CH}_2$, $\alpha\text{-CH}_2$	0.90 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.56 (m), 2.15 (t, $J = 6.0$ Hz)
3	异亮氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_3$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_3$	3.65 (d, $J = 3.6$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.27 (m), 0.96 (t, $J = 6.6$ Hz)
4	缬氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}$, $\gamma\text{-CH}_3$	3.60 (d, $J = 4.8$ Hz), 2.26 (m), 0.99 (d, $J = 7.2$ Hz)
5	丙酸	CH_2 , CH_4	2.19 (q, $J = 7.8$ Hz), 1.06 (t, $J = 7.2$ Hz)
6	乳酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_3$	1.34 (d, $J = 7.2$ Hz), 4.13 (q, $J = 7.2$ Hz)
7	丙氨酸	$\beta\text{-CH}_3$	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)
8	醋酸	CH_3	1.92 (s)
9	脯氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$	2.04 (m), 2.36 (m), 3.34 (m), 4.11 (m)
10	赖氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$	1.89 (m), 1.72 (m), 3.04 (t, $J = 7.8$ Hz)
11	氧化三甲胺	CH_3	3.26 (s)
12	甘氨酸	CH_2	3.56 (s)
13	苏氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}$, $\gamma\text{-CH}_3$	3.59 (d, $J = 4.8$ Hz), 4.26 (m), 1.33 (d, $J = 7.2$ Hz)
14	精氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$	3.76 (m), 1.90 (m), 1.72 (m), 3.25 (m)
15	谷氨酰胺	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$	3.78 (m), 2.15 (m), 2.46 (m)
16	谷氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$	3.75 (m), 2.08 (m), 2.36 (m)
17	天冬氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$	3.90 (m), 2.68 (m), 2.82 (m)
18	天冬酰胺	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$	3.92 (m), 2.86 (m), 3.03 (m)
19	尿囊酸	CH	5.40 (s)
20	尿嘧啶	5-CH, 6-CH	5.81 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz)
21	延胡索酸	CH	6.52 (s)
22	酪氨酸	CH, CH	6.90 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz)
23	苯丙氨酸	2,6-CH, 3,5-CH, 4-CH	7.43 (m), 7.33 (m), 7.38 (m)
24	次黄嘌呤	$N\text{-(2) CH} = \text{N}$, $N\text{-(7) CH} = \text{N}$	8.19 (s), 8.22 (s)

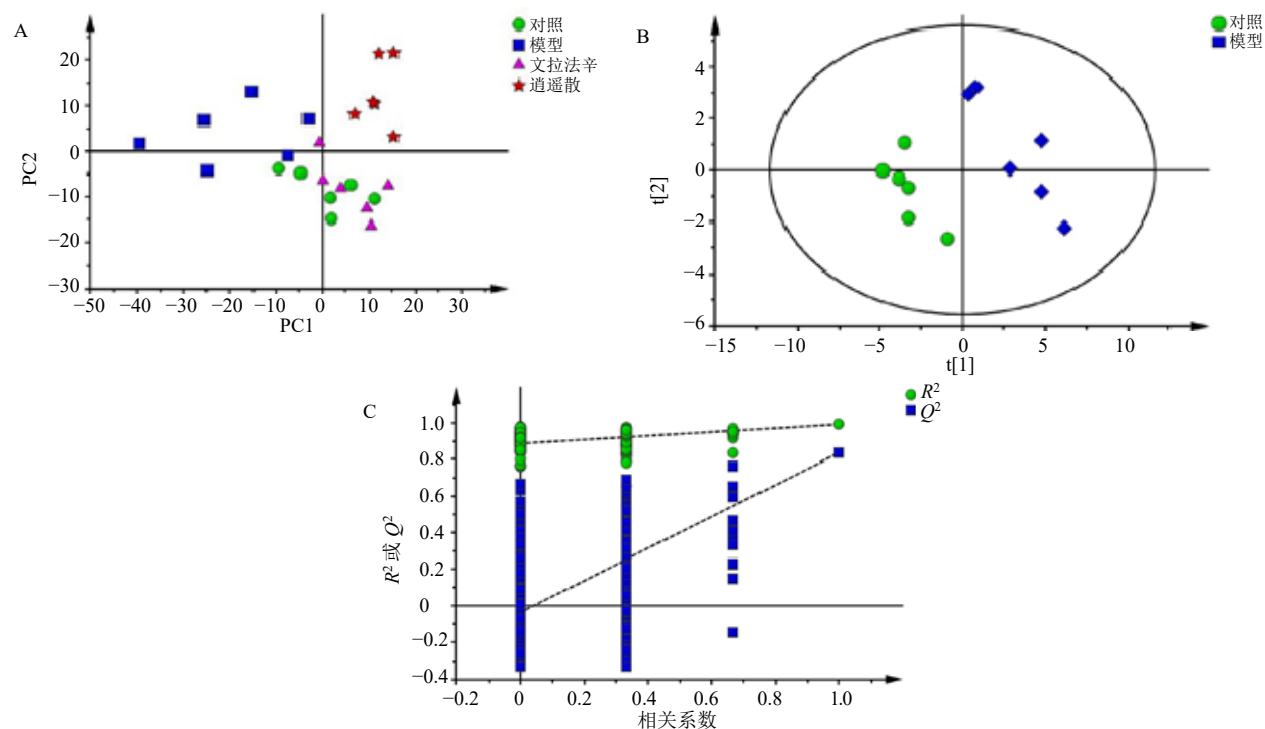


图 2 大鼠粪便样本 PCA 散点图 (A)、PLS-DA 散点图 (B) 和相应的模型验证图 (C)

Fig. 2 PCA score plot (A), PLS-DA score plot (B) and corresponding model validation plot (C) of rat fecal samples

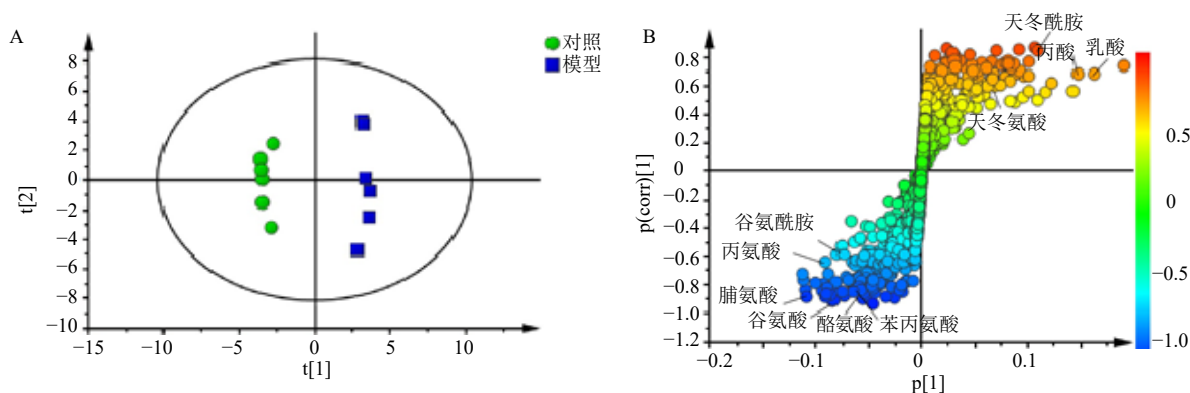


图 3 对照组与模型组大鼠粪便样本 OPLS-DA 散点图 (A) 和相应的 S-plot 图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (A) and corresponding S-plot (B) of faeces of rats in control and model groups

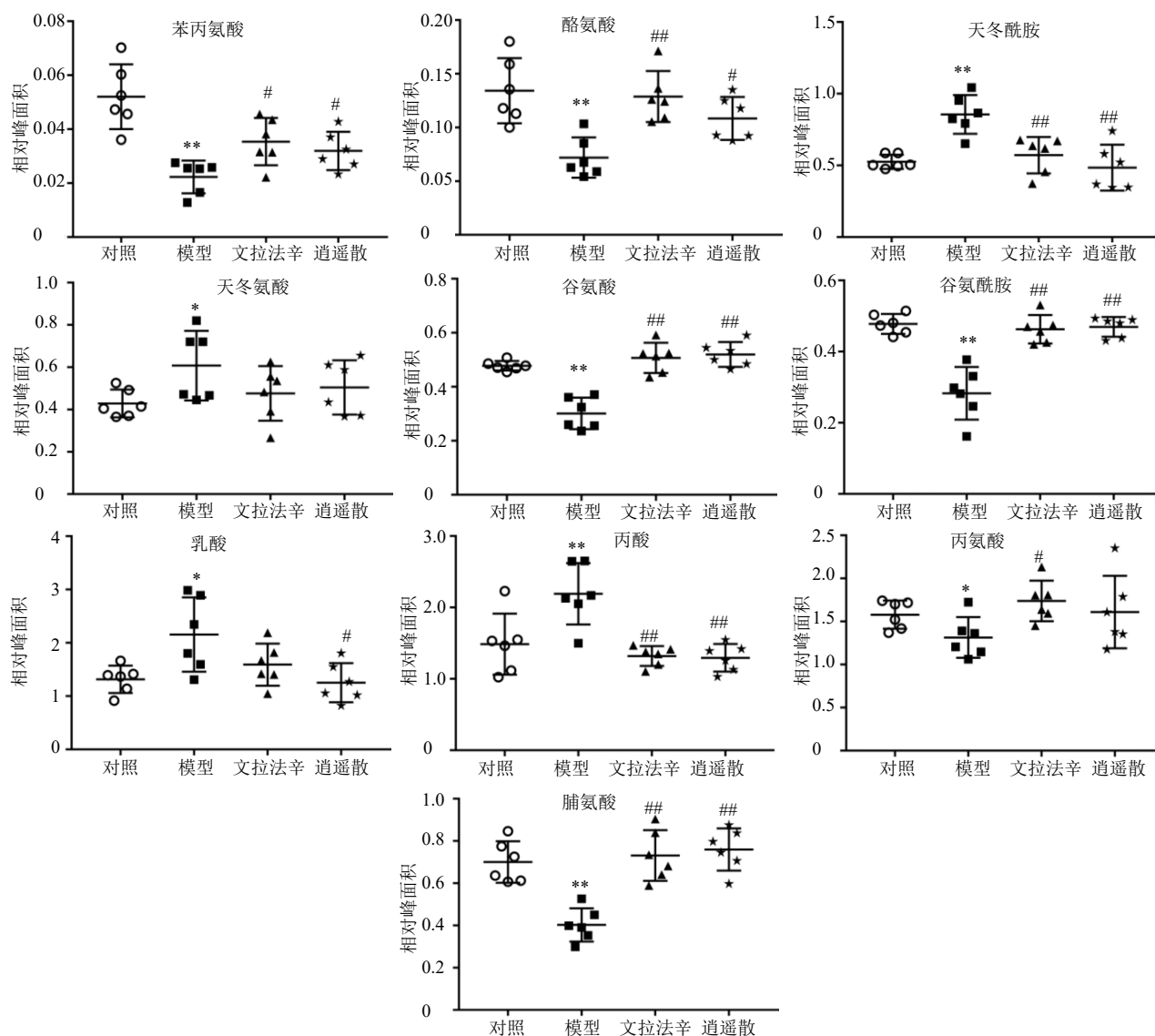


图 4 各组大鼠粪便样本中潜在生物标志物的变化

Fig. 4 Changes of potential bio-markers in rats of each group

3.5 逍遥散对 CUMS 抑郁大鼠粪便代谢紊乱的干预作用

从代谢轮廓看,逍遥散组与模型组明显分开(图 2-A),表明逍遥散能有效改善 CUMS 引起的抑郁状态。从代谢物水平,逍遥散能显著回调氨基酸(包括苯丙氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸)和有机酸(包括乳酸、丙酸)等 8 个差异代谢物的含量(图 4)。与模型组相比,逍遥散能显著升高苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸的水平,能显著降低天冬酰胺、乳酸和丙酸的水平。其中,对于天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺代谢物,逍遥散能回调到正常水平。对于乳酸、丙酸和脯氨酸代谢物,逍遥散显示过度回调的趋势。

3.6 差异代谢物相关性分析

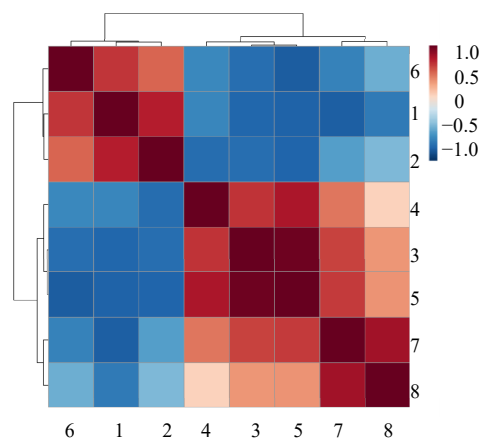
逍遥散显著回调的粪便样本中差异代谢物相关性分析如图 5 所示。可以看出,脯氨酸和谷氨酸具有较强的正相关,谷氨酸和天冬酰胺有较强的负相关;酪氨酸和苯丙氨酸正相关性较强,酪氨酸和丙酸负相关性显著。

3.7 代谢通路分析

将上述差异代谢物导入 MetPA (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 中进行通路分析。将 $\text{impact} > 0.1$ 的代谢通路作为潜在的靶标通路。与对照组比较,CUMS 抑郁大鼠粪便中 6 条代谢途径发生了显著变化:氨基酸 tRNA 生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,D-谷氨酸和 D-谷氨酰胺代谢,苯丙氨酸代谢,丙酮酸代谢(图 6-A)。这些代谢通路主要涉及蛋白质的生物合成、氨基酸

代谢、糖代谢和肠道微生物的代谢。

逍遥散显著回调的代谢通路有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,谷氨酸和谷氨酰胺代谢,苯丙氨酸代谢和丙酮酸代谢(图 6-B)。主要涉及氨基酸代谢、糖代谢和肠道微生物的代谢。综合 KEGG 及相关富集分析方法得到潜在生物标志物相关代谢通路,见图 7。



1-丙酸 2-乳酸 3-脯氨酸 4-谷氨酰胺 5-谷氨酸 6-天冬酰胺 7-酪氨酸 8-苯丙氨酸, 水平轴和垂直轴均代表变量信息; 颜色越深反映相关性越强, 颜色越浅反映相关性越弱; 棕色表示正相关, 蓝色表示负相关

1-propanoic acid 2-lactate 3-proline 4-glutamine 5-glutamate 6-asparagine 7-tyrosine 8-phenylalanine, The horizontal and the vertical axes in the figure represent variable information; The darker the color, the stronger the correlation; The lighter the color, the weaker the correlation; The brown indicates positive correlations while the blue indicates negative correlations

图 5 差异代谢物相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis results of differential metabolites

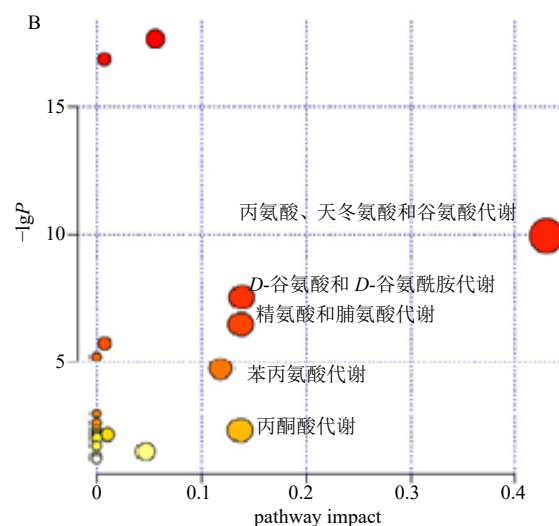
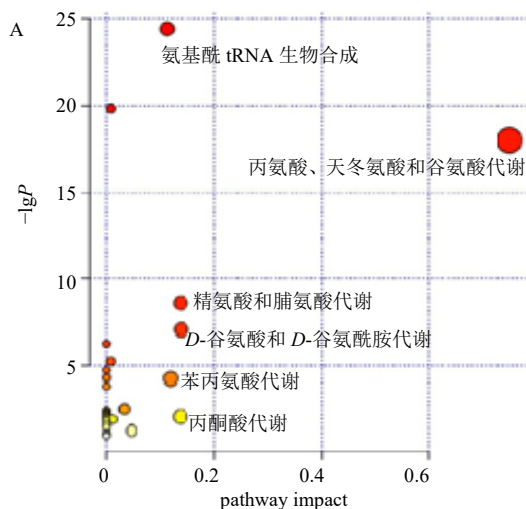
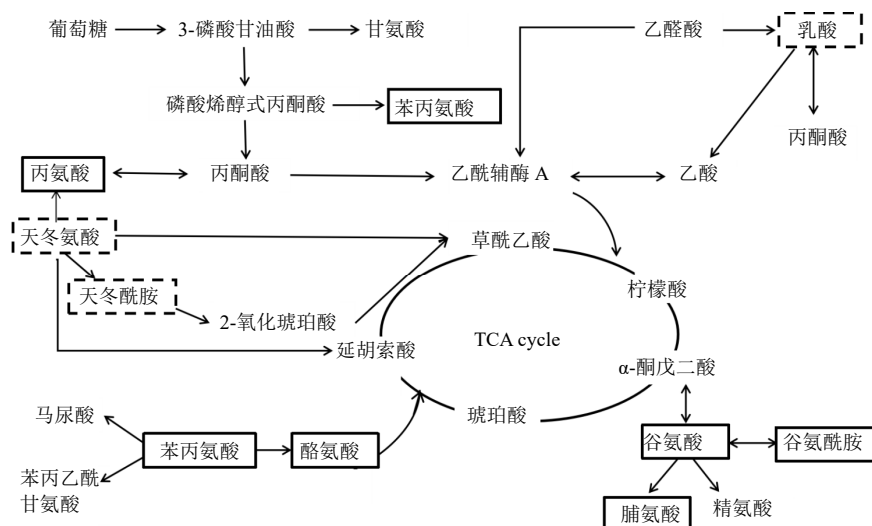


图 6 CUMS 抑郁模型相关的代谢通路 (A) 和与逍遥散抗抑郁作用相关的代谢通路 (B)

Fig. 6 Metabolic pathways associated with CUMS model of depression (A) and antidepressant effects of Xiaoyao Powder (B)



虚线方框代谢物：与对照组比较，模型组中含量显著升高；实线方框代谢物：与对照组比较，在模型组中含量显著降低
Metabolites in the dotted line box mean the contents in the model group significantly increased while metabolites in the solid line boxes mean the contents in the model group significantly decreased as compared with control group

图7 潜在生物标志物的相关代谢通路的网络示意图

Fig. 7 Metabolic networks of potential biomarkers in relevant metabolic pathways

4 讨论

现代药理和临床研究均已证明逍遥散对抑郁症有确切疗效。基于代谢组学技术的研究表明逍遥散抗抑郁作用机制主要涉及氨基酸代谢、能量代谢、酮体代谢和肠微生物代谢等多种代谢途径^[17]。近年来，肠道菌群在疾病发生、发展中的作用成为研究热点。肠道菌群能够调节机体代谢并维持肠道内环境的平衡^[18]。

有研究发现胃肠道菌群与大脑之间的关系密切^[19]。肠道菌群失调能够通过影响“脑-肠”轴功能紊乱，进而影响抑郁症的发生、发展^[18]。然而，目前尚未见从粪便代谢物的角度探讨逍遥散的抗抑郁作用及相关机制。本研究以抑郁大鼠粪便样本为对象，应用代谢组学技术结合多元统计分析探讨逍遥散抗抑郁的作用机制。

代谢组学作为一种系统的研究方法，直接反映体内生物化学过程和状态的变化，能在鉴别和确证药理和疾病模型上发挥作用，在发现药物本身的代谢变化的同时，更能捕捉到药物引起的内源性代谢物的变化^[20]。通过对粪便样品的检测，不仅可以反映代谢物的变化，还可了解肠道菌群的状态。本研究表明，CUMS 抑郁模型能引起大鼠粪便中代谢物含量发生变化，说明抑郁状态下，大鼠肠道菌群结构发生了变化，此变化进一步作用于机体，表现为一系列代谢紊乱的特征。

苯丙氨酸是人和动物不能在体内自行合成的必需氨基酸之一。体内苯丙氨酸含量是否充足直接影响中枢儿茶酚胺神经递质的水平。苯丙氨酸可以在苯丙氨酸羟化酶的作用下转变成酪氨酸^[21]。机体内儿茶酚胺类神经递质的代谢主要是由苯丙氨酸和酪氨酸通过羟化和脱羧等反应合成的^[22]。抑郁模型大鼠苯丙氨酸和酪氨酸水平较对照组显著降低，且苯丙氨酸和酪氨酸正相关性较强，可能是苯丙氨酸水平的降低导致转化而成的酪氨酸含量随之降低。

酪氨酸最重要的代谢是在酪氨酸羟化酶的作用下生成多巴。多巴在多巴脱羧酶的作用下生成多巴胺（DA）。多巴胺是大脑中含量最丰富的儿茶酚胺类神经递质，能够调控中枢神经系统的多种生理功能^[22]。多巴胺在多巴胺 β-羟化酶的作用下生成去甲肾上腺素（NE），NE 再经甲基转移酶的作用生成肾上腺素。肾上腺素（Adr）、NE、多巴及 DA 在神经系统中起着重要的作用。它们和神经活动、行为以及大脑皮层的醒觉和睡眠节律等都有关系^[23]。本实验中模型组大鼠体内酪氨酸水平较对照组降低，可能导致生成的 DA、NE 和 Adr 随之降低。之前有研究发现抑郁大鼠血液、脑组织中 NE 和 DA 含量显著低于空白组^[24-26]。抑郁症发病学说众多，其中神经递质紊乱是最早被发现和被验证的发病机制。本研究结果也验证了抑郁症与单胺类神经递质的密切关系。

丙酮酸是糖酵解的最终产物。丙酮酸在有氧条件下进入三羧酸循环,在无氧条件下通过加氧还原为乳酸。丙酮酸可通过转氨基作用直接生成丙氨酸,为蛋白质合成提供燃料^[27]。丙酮酸参与体内葡萄糖、脂肪和氨基酸代谢,在 3 大营养物质代谢联系中起着重要的作用^[28]。丙酮酸代谢通路中主要参与的代谢物有乳酸、丙酮酸、乙酸等,这些代谢物的变化可能会引起丙酮酸代谢通路的变化^[29]。研究表明血浆乳酸的增加与细胞的厌氧呼吸有关,是一种能量代谢过程,提示抑郁症大鼠能量代谢紊乱^[30]。与对照组相比,抑郁大鼠粪便样本中乳酸含量显著增加,说明 CUMS 导致能量代谢的紊乱,进而影响相关能量代谢物质含量异常,验证了抑郁症与能量代谢之间的相互关系。而逍遥散能够改善抑郁状态下的能量异常和相关物质代谢紊乱。

肠道微生物群由数千种不同的微生物种类和 15 000 多种细菌组成,是胃肠道首要保护系统。肠道微生物除了吸收机体养分,还通过自身的代谢帮助人体解毒并为人体提供有益代谢物。肠道菌群可以将人体难吸收的大分子糖类(抗性淀粉、植物纤维和难降解的多糖)酵解为短链脂肪酸而被宿主的肠道所吸收^[22]。因此,短链脂肪酸如丁酸、乙酸和丙酸等的代谢与肠道菌群的代谢高度相关,这些短链脂肪酸在人体体液中的含量能反映人体内肠道菌群的代谢状况,在维持大肠正常功能方面发挥重要作用^[31]。与对照组大鼠相比,抑郁大鼠粪便样本中丙酸水平显著升高,提示模型大鼠肠道菌群中产生丙酸盐的微生物较对照组有所增加,肠道菌群结构及功能紊乱可能参与了抑郁症的发生、发展。

天冬氨酸是一种兴奋性神经递质,在机体新陈代谢中参与多种代谢过程。在肝脏中相关酶的作用下,天冬氨酸转变为延胡索酸,参与三羧酸循环^[32]。模型组大鼠粪便样本中天冬氨酸和天冬酰胺的含量均有所升高,而逍遥散组能够显著回调天冬酰胺的水平,其发生机制和变化的意义尚缺乏文献报道,需要进一步研究。

谷氨酰胺是机体中含量最丰富的条件性必需氨基酸,在体内发挥着重要的生理功能,是糖代谢和氨基酸代谢的重要中间体,具有促生长、调节免疫、抗应激、抗疲劳、抗感染、维持酸碱平衡等作用^[23]。谷氨酰胺是肠道细胞的主要能量来源^[33]。胃肠道是谷氨酰胺利用的主要器官,正常生理情况下,肠道所需谷氨酰胺来源于食物的供给和体内合成,但在

病理状态下如创伤、应激、感染及各种危重症时,谷氨酰胺消耗增加,血液和组织中的谷氨酰胺水平降低^[34]。谷氨酰胺也是合成谷氨酸的重要前体^[35],谷氨酸是一种重要的神经递质,谷氨酸合成减少可能引发抑郁样行为。本次实验结果显示,CUMS 模型大鼠粪便样本中谷氨酰胺和谷氨酸的含量明显降低,原因可能为造模应激导致谷氨酰胺含量下降,谷氨酸合成异常导致抑郁行为发生。由于粪便样本本身代谢物来源较为复杂,影响粪便中谷氨酸含量的因素很多,包括食物的成分,肠道上皮细胞对谷氨酸的吸收和肠道微生物群的代谢^[36]等。

然而,有研究报道 CUMS 抑郁大鼠粪便样本中谷氨酰胺^[37]的含量升高,与本研究谷氨酰胺含量降低的结果相反。相同样本中同一差异代谢物变化可能会出现不一致的情况。例如,有研究显示,与空白组大鼠相比,CUMS 抑郁大鼠血浆中谷氨酸水平显著升高^[38],而另一研究发现 CUMS 大鼠血浆谷氨酸含量降低^[39]。这种不一致也显示了非靶标代谢组技术的局限性。一方面,由于内源性代谢物种类繁多,浓度动态范围大,代谢物识别的准确性不高^[40],所以,在后续研究中应进一步采用靶标代谢组学对潜在生物标志物进行验证和深入研究。另一方面,传统代谢组学只能检测到终端代谢物量的总和,而这一总量的变化受其“来路”和“去向”的影响。因此,追踪某一潜在生物标志物的“来龙去脉”也将有助于准确表征其含量的变化,避免出现检测结果不一致的现象。稳定同位素示踪技术^[41]可标记、追踪化合物分子内部某个或多个特定原子,进而实现定性、定量测定化合物的不同代谢途径或生成过程。

逍遥散能回调部分差异代谢物的含量,使其回归正常水平,具有明显的“纠偏”作用,说明逍遥散能改善 CUMS 引起的代谢轮廓异常和物质代谢紊乱,是逍遥散抗抑郁作用机制之一。本研究是以往逍遥散抗抑郁代谢组学研究的深入和补充,进一步从粪便代谢物的角度揭示了抑郁症的发病机制和逍遥散抗抑郁作用及作用机制。

综上所述,本研究应用基于 ¹H-NMR 技术的代谢组学方法分别分析了 CUMS 抑郁大鼠和正常大鼠、以及逍遥散组抑郁大鼠的粪便样本代谢谱的差异,并建立了相应的多元统计分析模型。共筛选出 10 种与抑郁相关的潜在生物标志物,逍遥散能调节其中 8 种差异代谢物的水平。逍遥散显著回调的代谢物涉及的代谢通路有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸

代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 谷氨酸和谷氨酰胺代谢, 苯丙氨酸代谢和丙酮酸代谢。这些代谢通路主要涉及氨基酸代谢、糖代谢和肠道微生物代谢途径。研究结果为全面、深入揭示抑郁症的发病机制和逍遥散的抗抑郁作用机制提供了实验依据、奠定了实验基础。

参考文献

- [1] World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates [EB/OL]. [2018-08-15]. <https://www.who.int/mentalhealth/management/depression/prevalenceglobalhealthestimates/en/>.
- [2] 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.
- [3] 梁媛, 赵晖, 岳利峰, 等. 逍遥散抗抑郁的临床与实验研究进展 [J]. 新中医, 2017, 49(10): 142-145.
- [4] 熊静悦, 曾南, 张崇燕, 等. 逍遥散抗抑郁作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 3-5.
- [5] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1157-1161.
- [6] 郭晓擎. 复方柴归方抗抑郁有效组分筛选及其药效学评价研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [7] 梁琦, 谢鸣, 倪诚, 等. 广防己配伍黄芪肾毒性的代谢组学研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(1): 42-43.
- [8] 皮子凤, 门丽慧, 张静, 等. 五味子治疗大鼠糖尿病肾病作用机制的血清代谢组学研究 [J]. 分析化学, 2015, 43(2): 169-175.
- [9] Vanden Bussche J, Marzorati M, Laukens D, *et al.* A validated high resolution mass spectrometry-based approach for metabolomic fingerprinting of the human gut phenotype [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(21): 10927-10934.
- [10] Zeng H, Grapov D, Jackson M I, *et al.* Integrating multiple analytical datasets to compare metabolite profiles of mouse colonic-cecal contents and feces [J]. *Metabolites*, 2015, 5(3): 489-501.
- [11] Saric J, Wang Y, Li J, *et al.* Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(1): 352-360.
- [12] 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] // 中国药理学学会药理学发展前沿论坛及药理学博士论坛论文集 [C]. 北京: 中国药理学学会, 2008.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Willner P, Towell A, Sampson D, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [16] 许腾, 张潇, 高耀, 等. 柴归颗粒对抑郁症伴发症状的改善作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3846-3851.
- [17] 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.
- [18] Leulier F, Macneil L T, Lee W, *et al.* Integrative physiology: At the crossroads of nutrition, microbiota, animal physiology, and human health [J]. *Cell Metabolism*, 2017(3): 522-534.
- [19] 陶伟伟, 董宇, 刘立, 等. 基于“脑-肠”轴的肠道菌群影响抑郁症研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(2): 234-240.
- [20] 刘晓节, 郑兴宇, 李震宇, 等. 慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠脑组织 ^1H -NMR 代谢组学研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 612-621.
- [21] 王芳, 奚耕思, 刘丽萍, 等. 苯丙氨酸羟化酶的研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(4): 372-377.
- [22] 贾伟. 医学代谢组学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011.
- [23] 吴艳. 大鼠的运输应激及谷氨酰胺的抗应激研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [24] 郭秉荣, 杨岚, 刘佳丽, 等. 慢性不可预知应激诱导的抑郁大鼠血清中神经递质含量的动态变化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(2): 138-144.
- [25] 贾广成, 郑兴宇, 周玉枝, 等. 逍遥散对 CUMS 模型大鼠行为学及血浆内单胺类神经递质的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 136-140.
- [26] 张媛媛. 抑郁大鼠不同脑区神经递质变化的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2009.
- [27] 喻文, 谢志毅, 胡森. 丙酮酸抗休克的研究进展 [J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(1): 61-64.
- [28] 周爱儒. 生物化学 [M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [29] 米热阿依·亚力昆. 二乙基亚硝胺诱导的肝癌大鼠模型的代谢组学研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- [30] Zheng S N, Zhang S S, Li F M, *et al.* An ^1H -NMR and UPLC-MS-based plasma metabolomic study to investigate the biochemical changes in chronic unpredictable mild stress model of depression [J].

- Metabolomics*, 2011, 7(3): 413-423.
- [31] Dolara P, Caderni G, Salvadori M, *et al.* Fecal levels of short-chain fatty acids and bile acids as determinants of colonic mucosal cell proliferation in humans [J]. *Nutr Cancer*, 2002, 42(2): 186-190.
- [32] 孟 欣, 单进军, 谢 彤, 等. 基于 GC-MS 代谢组学的黄芩素干预 RSV 肺炎小鼠肝损害作用机制探究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1544-1547.
- [33] 刘 刚, 周建平, 董 明. 谷氨酰胺临床研究进展 [J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(9): 1081-1083.
- [34] 刘江碧, 熊小明. 谷氨酰胺在肠道中的作用研究进展 [J]. 中药与临床, 2019, 10(2): 60-62.
- [35] Noh H S, Hah Y S, Nilufar R, *et al.* Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(4): 702-709.
- [36] Burrin D G, Stoll B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut [J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3): 850S-856S.
- [37] 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.
- [38] Shi B Y, Tian J S, Xiang H, *et al.* A ^1H -NMR plasma metabonomic study of acute and chronic stress models of depression in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 241: 86-91.
- [39] Liu X J, Zhou Y Z, Qin X M, *et al.* Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: A plasma metabonomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 578-588.
- [40] 刘月涛, 胡英还, 秦雪梅. 非靶标代谢组学研究的影响因素分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 86-93.
- [41] 令狐婷, 刘少博, 高 耀, 等. 稳定同位素示踪技术在内源性物质代谢调控中的应用进展 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2678-2685.