

基于 UPLC-MS 的吴茱萸汤对虚寒呕吐大鼠血清代谢谱的影响

康 辉¹, 陈天朝^{1*}, 姬海南², 隋 峰^{2*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

摘 要: **目的** 以虚寒大鼠为模型, 观察吴茱萸汤对模型大鼠血清代谢谱的影响, 探讨其治疗虚寒呕吐证可能的内在作用机制。 **方法** 采用复合法(大黄+顺铂)制备虚寒呕吐模型。通过超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)技术非靶向获取虚寒呕吐大鼠血清的高通量代谢组数据, 结合多元变量分析和数据库检索, 对不同组别大鼠血清中内源性代谢物进行分析, 筛选鉴定出潜在的差异代谢物, 并通过 Metabo Analyst 软件进行代谢通路分析。 **结果** 血清代谢谱对照组和模型组完全分离, 吴茱萸汤给药组靠近对照组, 表明从机体内源性物质变化的水平模型复制成功, 且吴茱萸汤在一定程度上能够干预大鼠的虚寒呕吐症状, 提示吴茱萸汤干预后机体具有恢复到正常状态的趋势。对筛选出来的 35 种差异性代谢物进行通路分析, 发现虚寒呕吐证的机制可能与体内脂代谢、氨基酸代谢通路异常相关, 且吴茱萸汤对其通路可能具有调控作用; 网络模块化分析发现 7 个模块之间关系密切, 焦谷氨酸、花生四烯酸、5-羟基色胺、异柠檬酸、三酰甘油等生物靶点可作为虚寒呕吐证的生物标志物。 **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虚寒呕吐大鼠体内紊乱的氨基酸代谢、能量代谢、脂代谢等有关。

关键词: 吴茱萸汤; 超高效液相色谱-质谱; 代谢组学; 血清; 虚寒呕吐; 生物标记物

中图分类号: R285.5; R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-6006-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.013

Effect of Wuzhuyu Decoction on serum metabolic spectrum in rats with deficiency cold and vomiting based on UPLC-MS

KANG Hui¹, CHEN Tian-chao¹, JI Hai-nan², SUI Feng²

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Wuzhuyu Decoction on the serum metabolic profile of the model rats with deficiency cold, and explore its possible mechanism for treating deficiency cold and vomiting syndrome. **Methods** A rat model of deficiency cold and vomiting was prepared by a composite method (*Rhei Radix* et *Rhizoma* + cisplatin). The high-throughput metabolome data of the serum of rats with deficiency-cold and vomiting was obtained by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS), and multivariate analysis combined with database retrieval was used to analyzed the endogenous metabolites in rat serum from different groups and discover differential metabolites. Besides, metabolites were analyzed by Metabo Analyst software for possible metabolic pathways. **Results** The serum metabolic spectrum of control group and model group were completely separated. The Wuzhuyu Decoction group was close to the control group, indicating that the horizontal model of endogenous material changes was successfully replicated, and Wuzhuyu Decoction could interfere with the symptoms of deficiency cold and vomiting in rats, suggesting that the rat body had a tendency to return to normal state. In total, modular analysis of 35 serum differential metabolites, and deficiency cold and vomiting syndrome was related to abnormal lipid metabolism and amino acid metabolism pathways and Wuzhuyu Decoction may have a regulatory effect on its pathways; Metabolites revealed close relationship among seven modules; Pyroglutamic acid, arachidonic acid, serotonin, isocitric acid, triglyceride and other biological targets can thus

收稿日期: 2020-05-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81274112); 国家自然科学基金面上项目(81373986); 国家自然科学基金面上项目(81473372)

作者简介: 康 辉, 硕士, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: 675915304@qq.com

*通信作者 隋 峰, 博士, 研究员, 从事中药药性和药理研究。E-mail: suifeng2136@126.com

陈天朝, 博士, 教授, 从事中药药性和药理研究。E-mail: 13700845011@163.com

be used as biomarkers of deficiency cold and vomiting. **Conclusion** Wuzhuyu Decoction can improve the physiological characteristics of the model of deficiency-cold and vomiting. The mechanism may be related to the regulation of abnormal amino acid metabolism, energy metabolism, and lipid metabolism in rats with deficiency-cold vomiting.

Keywords: Wuzhuyu Decoction; ultra-high liquid chromatography-mass spectrometry; metabolomics; serum; deficiency cold and vomiting; biomarker

呕吐是临床上常见症状,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]。多种疾病如运动病、内耳眩晕症、消化道疾病等中均存在该症状,部分患者因难以忍受剧烈呕吐而中断或放弃治疗。因此,如何解决呕吐成为众多医家关注的焦点。

吴茱萸汤是源自张仲景《伤寒论》的经典名方,证见厥阴之胜、耳鸣头眩、愤愤欲吐、胃膈如寒^[2]。该方由吴茱萸、人参、生姜、大枣 4 味中药组成,具有温胃补虚之效,用于治疗胃气虚寒所致阳明寒呕、少阴吐利、厥阴头痛^[3]。人参价格昂贵,历代医家多以党参代之,其功效与人参相近,在该方中与人参配伍意义大致相同^[4]。方中吴茱萸既可散寒降逆止呕,又能疏肝解郁温胃;党参补气健脾,温中补虚;生姜温胃散寒降逆,与吴茱萸相辅相成;大枣温中补虚,君臣佐使合用,共奏可散可降,又温又补之功^[5]。课题组前期研究表明,吴茱萸汤对虚寒呕吐有较好的改善作用^[6-7]。

代谢组学是系统生物学研究的重要组成部分,分析技术具有高通量、高灵敏度、高精确度的特点,使生物体内源性代谢物质的变化规律与疾病的生理病理变化相契合^[8]。代谢组学研究思路具有整体性、动态性和系统性的特点,与中医学的哲学思想具有一致性^[9]。因此,本研究采用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)技术结合代谢组学,观察虚寒呕吐模型大鼠血清代谢组学的变化,以期从代谢组学角度阐明虚寒呕吐证的物质基础,为中医证本质研究提供生物学基础,为阐明吴茱萸汤治疗虚寒呕吐的作用机制提供思路。

1 材料

1.1 药材

吴茱萸、党参、大枣、大黄饮片均购于北京同仁堂(集团)有限责任公司,生姜购于北京东直门菜市场,经中国中医科学院中药研究所隋峰研究员鉴定,均符合《中国药典》2015 年版规定。吴茱萸汤和大黄水煎液按照文献方法提取^[7]。经 HPLC 多成分含量分析^[13],吴茱萸汤主要含黄酮和皂苷类化合物,其中含主要活性成分吴茱萸碱 0.245 mg/kg、吴

茱萸次碱 0.13 mg/kg、吴茱萸内酯 8.95 mg/kg、芦丁 0.43 mg/kg、6-姜辣素 0.95 mg/kg,符合相关要求。

1.2 试剂与仪器

顺铂(质量分数 $\geq 99.99\%$,批号 15663-27-1)购自美国 Sigma 公司;甲醇、甲酸、甲酸铵、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

88700V 型 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱、UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪、Q-Exactive 型质谱仪均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;DV215CD 型电子天平购自德国赛多利斯公司;MS304TS/02 型电子天平购自瑞士梅特勒-托利多公司;Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪购自美国 Millipore 公司;X-30R 型离心机购自美国 Sigma 公司。

1.3 动物

SD 雄性大鼠 30 只,6~8 周龄,合格证号 SCXK(军)2012-0004,体质量(200 ± 20)g,购自军事医学科学院,饲养于中国检验检疫研究院实验动物中心。大鼠适应性饲养 1 周后进行实验。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 分组与给药

将大鼠随机分成对照组、模型组、吴茱萸汤(20 g/kg)组,每组 10 只,单笼饲养。对照组大鼠 ig 生理盐水,其余两组大鼠 ig 大黄水煎液(10 mL/kg,1 mL 含 1 g 生药量),0.5 h 后吴茱萸汤组 ig 吴茱萸汤(20 mL/kg,1 mL 含 1 g 生药量),1 次/d,连续 15 d。对照组大鼠分别于第 1、10 天 ip 生理盐水注射液(2 mL/kg),其余各组 ip 顺铂(30 mg/kg,以生理盐水配制成质量浓度为 15 mg/mL 的溶液),1 次/d。从第 7 天开始,各组大鼠用饲料与高岭土混合饲养^[7]。

2.2 血清样本的收集与制备

末次给药后所有大鼠禁食不禁水 24 h,腹主动脉取血,3 500 r/min 离心 15 min,分离血清,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。分析前冰浴复融,取 50 μL 血清,精密加入乙腈 450 μL ,涡旋 30 s,13 000 r/min 离心 15 min,上清液进样检测。

2.3 血清分析的检测条件

2.3.1 色谱条件 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 甲酸铵水溶液, 流动性 B 为乙腈, 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。

2.3.2 质谱条件 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, 鞘气流量为 1.05×10^4 mL/min (35 arb), 辅助气流量为 3×10^3 mL/min (10 arb), 毛细管温度 320 °C, 一级全扫描, 分辨率 70 000, 数据采集范围 m/z : 50~1 050, 二级数据依赖性扫描 (full MS/dd-MS²), 分辨率 17 500, 阶梯归一化碰撞能分别为 20、40、60 eV^[6]。

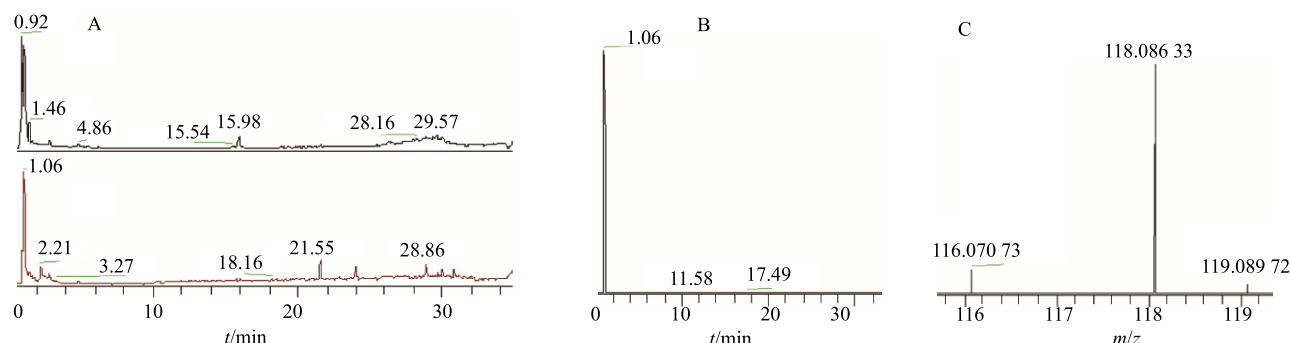
2.4 数据处理及分数据

采用 mzCloud 对内源性代谢物质进行鉴定, 包括分子式、相对分子质量、二级碎片离子等, 同时在 TraceFinder 3.2.0 软件自建内源性物质^[10], 并分别在 Metlin 数据库、人类代谢组数据库 (HMDB)^[14]、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库^[15-16] 中进行检索和确认。数据采用 MetaboAnalyst 3.3.0 进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)、拓扑分析, 使用 R 统计软件包 R×64 3.2.4 (<http://cran.r-project.org>) 进行高通量代谢通路分析^[17]。利用 Cytoscape 3.3.0、MetScape、MCL、MCODE 插件绘制内源性物质网络图模块化分析。

3 结果

3.1 大鼠血清的检测

模型组大鼠血清样品的总离子流色谱图见图 1。



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 1.06 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, 1.06 min appeared in peak corresponding to the parent ion fragmentation

图 1 模型组大鼠血清总离子流图及缬氨酸鉴别模式识别

Fig. 1 Serum total ion maps and valine identification pattern recognition of rats in model group

3.2 血清代谢组学的初步分析

用无监督的 PCA 对对照组和模型组之间的差异进行分析, 如图 2-A 所示, 各组数据的聚类情况较好, 无可剔除的样本。为了获取更加理想的组间分离并增强对分类贡献大的变量的识别, 进一步对对照组、模型组、吴茱萸汤组进行有监督的 PLS-DA, 如图 2-B~C 所示, 在各组样本血清的 PLS-DA 得分图中, 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。模型的估计模型的预测能力 (Q^2) = 0.812 (R^2X = 0.975、 R^2Y = 0.924), 吴茱萸汤组与模型组分开, 但有向对照组靠近的趋势, 说明与模型组的偏离情况相比, 吴茱萸汤组有所改善。

3.3 潜在生物标志物的验证及鉴定

3.3.1 潜在生物标志物的验证 通过改变诊断临界值, 获得多对灵敏度与特异度值, 以灵敏度为横坐标, (1-特异度) 为纵坐标, 绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 然后利用 ROC 曲线下面积来评价诊断效率^[18-19]。如图 3 所示, 差异性代谢物曲线下面积均大于 0.9, 说明通过 PLS-DA 处理后, 筛选出的差异性代谢物具有较高的准确性。

3.3.2 潜在生物标志物的鉴定 采用“2.4”项方法得到 1 个 30 血清样本×126 变量的数据矩阵。在 PLS-DA 模型中提取 VIP 值最大的前 48 个变量 ($VIP > 1.0$), 这 48 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 35 个变量为代谢标志物,

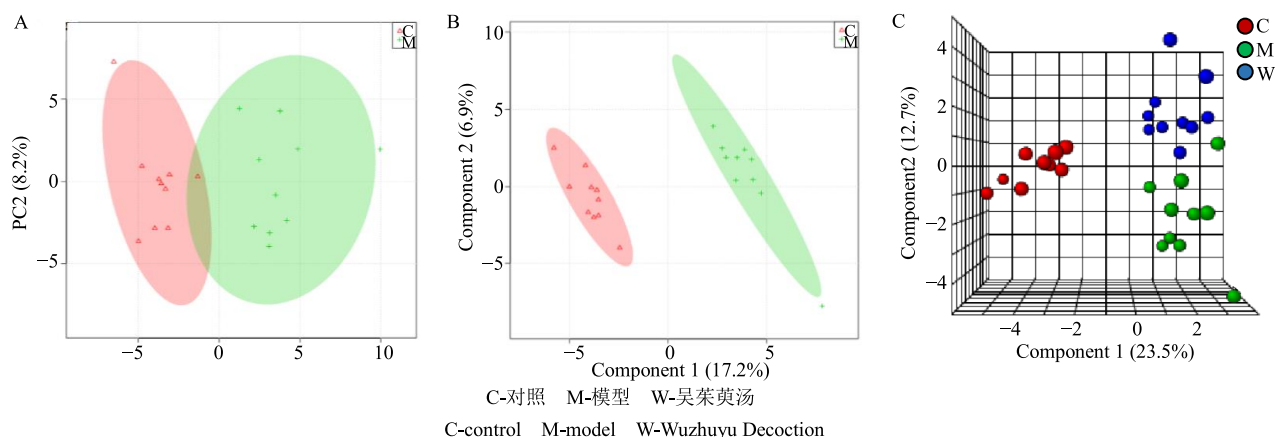


图 2 对照和模型组大鼠血清 PCA (A)、PLS-DA (B) 得分图和对照、模型、给药组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (C)

Fig. 2 PCA (A) and PLS-DA (B) scores of serum in control group and model group, PLS-DA scores (C) of serum in control group, model group and administration group

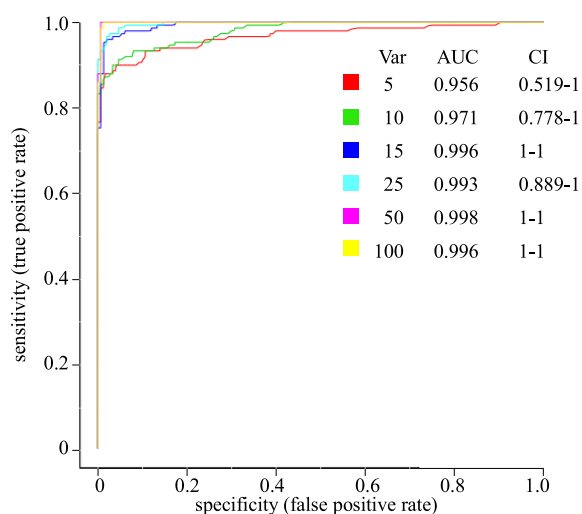


图 3 对照、模型组大鼠血清样本的多元化 ROC 曲线分析

Fig. 3 Comparison of control and model groups of serum samples from multiple ROC curve analysis

其质谱数据信息如表 1、2 所示。与对照组相比,模型组中 5-羟基色胺、棕榈油酸、三甲基胺氧化物等 16 个化合物相对离子强度明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 胞嘧啶、脯氨酸、月桂酸等 19 个化合物相对离子强度明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。经吴茱萸汤干预后,上述 35 个差异性代谢物均有向正常水平靠近的趋势,说明吴茱萸汤对这些差异性代谢物具有一定的调节作用。

3.4 潜在生物标志物的通路分析

利用 MetaboAnalyst 3.3.0 对 35 个差异性代谢物进行代谢通路的富集分析,选择 KEGG 数据库,通路影响值的临界值设定为 0.10,高于这个值,则认为是潜在的靶标路径,如图 4、表 3 所示,共得到亚油酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、花生四烯酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、氨基酰基-tRNA

表 1 潜在生物标志物在各组大鼠血清中的相对含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Relative contents of potential biomarkers in serum of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

编号	差异性代谢物	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		
		对照	模型	吴茱萸汤/(5 g·kg ⁻¹)
1	5-羟基色胺	3.46 ± 0.95	5.64 ± 0.80*	3.58 ± 0.93
2	棕榈油酸	2.41 ± 0.56	5.18 ± 0.27*	2.45 ± 0.61
3	L-亮氨酸	3.33 ± 1.08	1.77 ± 0.73 ¹ *	1.92 ± 0.98*
4	儿茶酚	1.49 ± 0.94	0.84 ± 0.19 ¹ *	0.85 ± 0.15
5	月桂酸	9.82 ± 0.20	5.61 ± 0.86*	6.07 ± 1.51*
6	十四烷酸	1.58 ± 0.22	1.10 ± 0.12*	1.62 ± 0.25
7	三甲基胺氧化物	1.43 ± 0.74	3.05 ± 0.97*	2.15 ± 0.42
8	肌酐	3.08 ± 0.51	4.45 ± 0.10*	3.57 ± 0.95
9	胞嘧啶	1.86 ± 0.15	1.41 ± 0.31**	1.67 ± 0.30
10	马尿酸	0.73 ± 0.72	1.52 ± 0.28*	1.16 ± 0.42
11	脯氨酸	1.60 ± 0.17	0.77 ± 0.12**	0.78 ± 0.24**
12	7-脱氢胆固醇	3.33 ± 0.28	2.04 ± 0.93**	2.22 ± 0.50*
13	异柠檬酸	2.45 ± 0.92	1.29 ± 0.52**	1.42 ± 0.27**
14	甘氨酸脱氧胆酸	3.62 ± 0.13	0.65 ± 0.13**	0.66 ± 0.44**
15	肌酸	6.35 ± 1.27	3.94 ± 0.47*	4.28 ± 0.97

续表 1

编号	差异性代谢物	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		
		对照	模型	吴茱萸汤/(5 g·kg ⁻¹)
16	胆酸	3.50±0.54	2.19±1.15*	2.44±0.05
17	花生四烯酸	0.94±0.19	6.33±0.39**	1.07±0.77
18	葡糖酸内酯	3.82±0.64	3.12±0.79*	3.32±0.45
19	2-甲基马尿酸	0.55±0.11	1.01±0.47*	0.60±0.23
20	α -亚麻酸	1.72±0.28	4.54±0.41**	2.34±0.91
21	维生素 D ₃	1.96±0.22	1.35±0.71*	1.58±0.95
22	丙三羧酸	0.29±0.05	1.14±0.04*	1.10±0.12*
23	乙基丙二酸	2.20±0.88	0.60±0.17*	1.00±0.04
24	二十碳五烯酸	8.68±2.79	5.41±0.28*	5.92±0.73*
25	天冬氨酸	6.16±3.16	1.58±0.28**	2.34±0.10*
26	4-羟基苯甲酸	8.43±0.68	4.13±0.95**	4.80±0.78*
27	富马酸	1.40±0.54	2.43±0.46*	1.30±0.18
28	焦谷氨酸	3.09±0.10	4.89±0.24*	3.14±0.29
29	三酰甘油	0.70±0.31	1.11±0.32*	0.71±0.05
30	肌氨酸	1.66±0.78	5.29±0.43*	1.83±0.84
31	苯甲酸	0.72±0.42	1.60±0.74*	0.75±0.09
32	谷氨酸	4.64±0.25	2.02±0.68*	2.31±0.28*
33	甲基鸟苷	1.73±0.97	4.48±0.20**	4.08±0.59*
34	脱氧胆酸	6.76±0.29	3.84±0.72*	4.64±0.87
35	N ₂ ,N ₂ -二甲基鸟苷	1.65±0.35	4.11±0.38**	3.27±0.64

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 2 吴茱萸汤组及模型组大鼠血清中潜在生物标志物的相关信息

Table 2 Information of potential biomarkers in serum of rats from Wuzhuyu Decoction treatment group and model group

差异性代谢物	t_R /min	m/z	δ	分子式	离子模式
5-羟基色胺	7.37	177.102 23	0.41	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	[M+H] ⁺
棕榈油酸	27.47	255.232 95	0.69	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺
L-亮氨酸	2.97	132.101 90	1.30	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺
儿茶酚	21.61	111.044 05	1.42	C ₆ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺
月桂酸	24.90	199.170 35	1.61	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	[M-H] ⁻
十四烷酸	27.28	227.201 65	2.04	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	[M-H] ⁻
三甲基胺氧化物	1.22	76.075 69	0.39	C ₃ H ₉ NO	[M+H] ⁺
肌酐	1.16	114.066 18	0.69	C ₄ H ₇ N ₃ O	[M+H] ⁺
胞嘧啶	1.16	112.050 23	2.05	C ₄ H ₅ N ₃ O	[M+H] ⁺
马尿酸	2.59	178.050 96	0.11	C ₉ H ₉ NO ₃	[M-H] ⁻
脯氨酸	4.54	114.056 05	1.63	C ₅ H ₉ NO ₂	[M-H] ⁻
7-脱氢胆固醇	20.62	385.346 49	0.03	C ₂₇ H ₄₄ O	[M+H] ⁺
异柠檬酸	1.08	191.019 72	0.75	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻
甘氨酸脱氧胆酸	22.01	448.306 84	0.31	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	[M-H] ⁻
肌酸	1.16	132.076 75	0.45	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺
胆酸	22.69	407.280 29	2.51	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	[M-H] ⁻
花生四烯酸	22.77	303.232 95	1.84	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻
葡糖酸内酯	1.83	177.040 46	0.74	C ₆ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻
2-甲基马尿酸	1.19	192.066 61	0.11	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻
α -亚麻酸	27.65	279.232 95	2.00	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
维生素 D ₃	21.06	385.346 49	1.57	C ₂₈ H ₄₄ O	[M+H] ⁺
丙三羧酸	15.03	175.024 31	0.43	C ₆ H ₈ O ₆	[M+H] ⁺
乙基丙二酸	1.13	129.019 33	1.16	C ₅ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻
二十碳五烯酸	26.92	301.217 30	1.21	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
天冬氨酸	0.98	132.030 23	4.33	C ₄ H ₇ NO ₄	[M-H] ⁻
4-羟基苯甲酸	2.97	137.024 41	1.42	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻
富马酸	4.40	115.003 68	1.68	C ₄ H ₄ O ₄	[M-H] ⁻
焦谷氨酸	0.92	128.035 31	1.08	C ₅ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻
三酰甘油	30.00	316.284 62	2.74	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	[M+H] ⁺
肌氨酸	1.13	88.040 40	2.63	C ₃ H ₇ NO ₂	[M-H] ⁻
苯甲酸	3.42	121.029 50	2.12	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻
谷氨酸	1.03	148.060 43	1.06	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺
甲基鸟苷	10.75	311.122 42	1.02	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻
脱氧胆酸	23.98	391.285 38	2.21	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	[M-H] ⁻
N ₂ ,N ₂ -二甲基鸟苷	10.79	311.122 42	1.22	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻

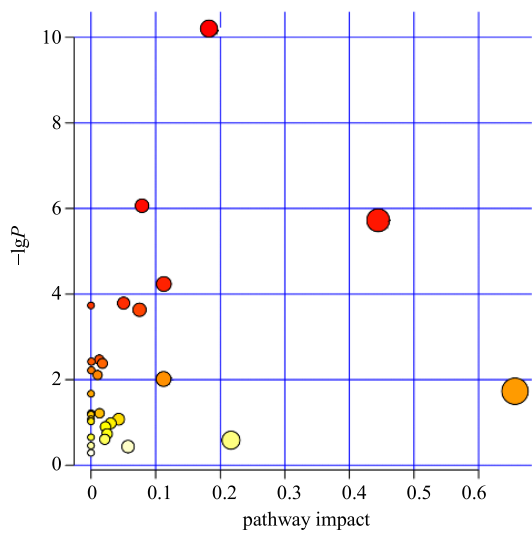


图 4 潜在生物标志物的代谢通路分析
Fig. 4 Analysis on metabolic pathways of potential biomarkers regulated by MetPA

表 3 潜在生物标志物经 MetPA 分析得到的代谢通路
Table 3 Metabolic pathways of potential biomarkers obtained by MetPA analysis

编号	代谢通路	总计	节点
1	linoleic acid metabolism	5	1
2	alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	1
3	arachidonic acid metabolism	9	1
4	arginine and proline metabolism	24	2
5	aminoacyl-tRNA biosynthesis	11	1
6	D-glutamine and D-glutamate metabolism	36	1

生物合成、D-组胺和 D-谷氨酸代谢 6 条相关的潜在代谢通路。表明在造模过程中上述 6 条代谢通路受到了较大干扰。

3.5 差异性代谢物的分析

3.5.1 相关性分析 血清中 35 个差异性代谢物的相关性分析如图 5 所示，图中 X 轴和 Y 轴均代表内源性物质的变量信息，颜色越深反映其内源性物质的

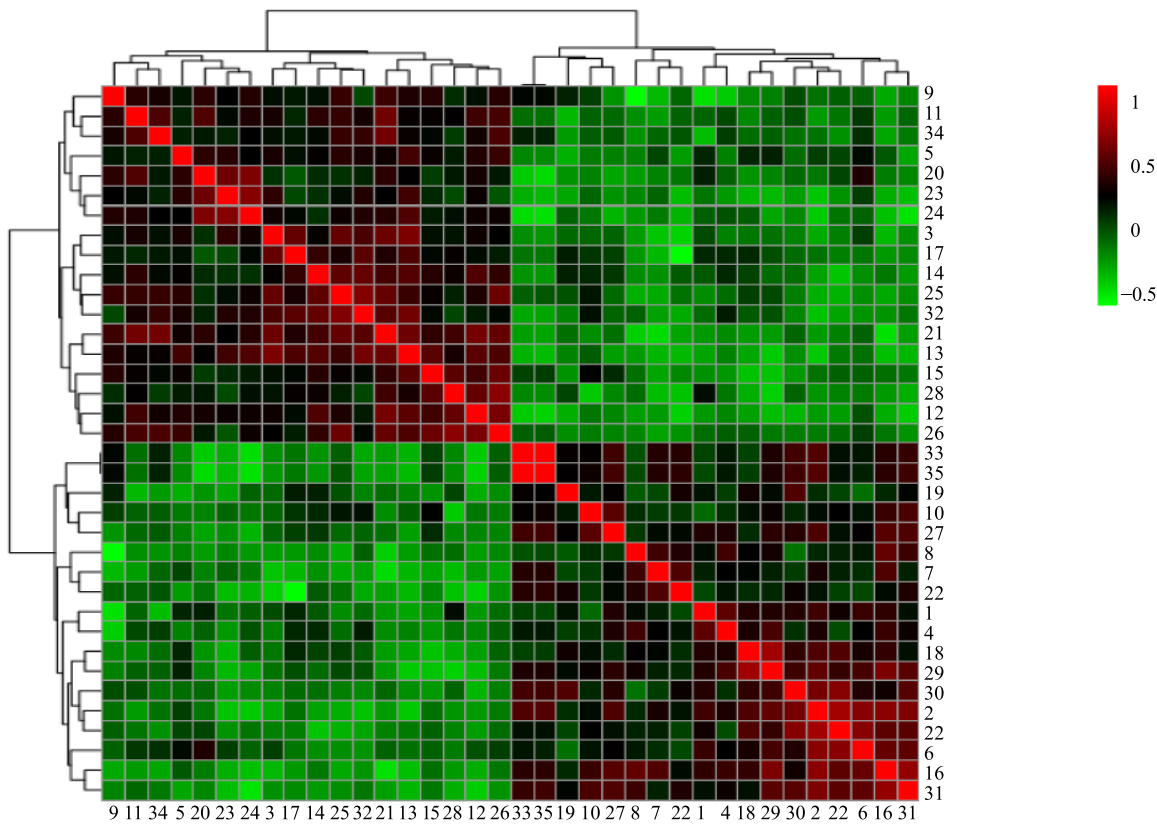


图 5 差异性代谢物的相关分析
Fig. 5 Relevant results of biomarker analysis

相关性越强，红色表示正相关，绿色表示负相关。结果从 X 轴来看，在同一小分支下的内源性物质正相关性最强，即某一个内源性物质含量升高或者降低，则与之相关性强的内源性物质含量会随之升高或降低。

3.5.2 分层聚类分析 如图 6 所示，热图可直观显示出 35 个差异性代谢物在各组间的含量变化趋势。图中 X 轴和 Y 轴分别代表样品与变量信息，颜色深浅反映变量值大小，红色表示含量最高，绿色表示含量最低，Y 轴中的分叉越近说明相似度越高。对

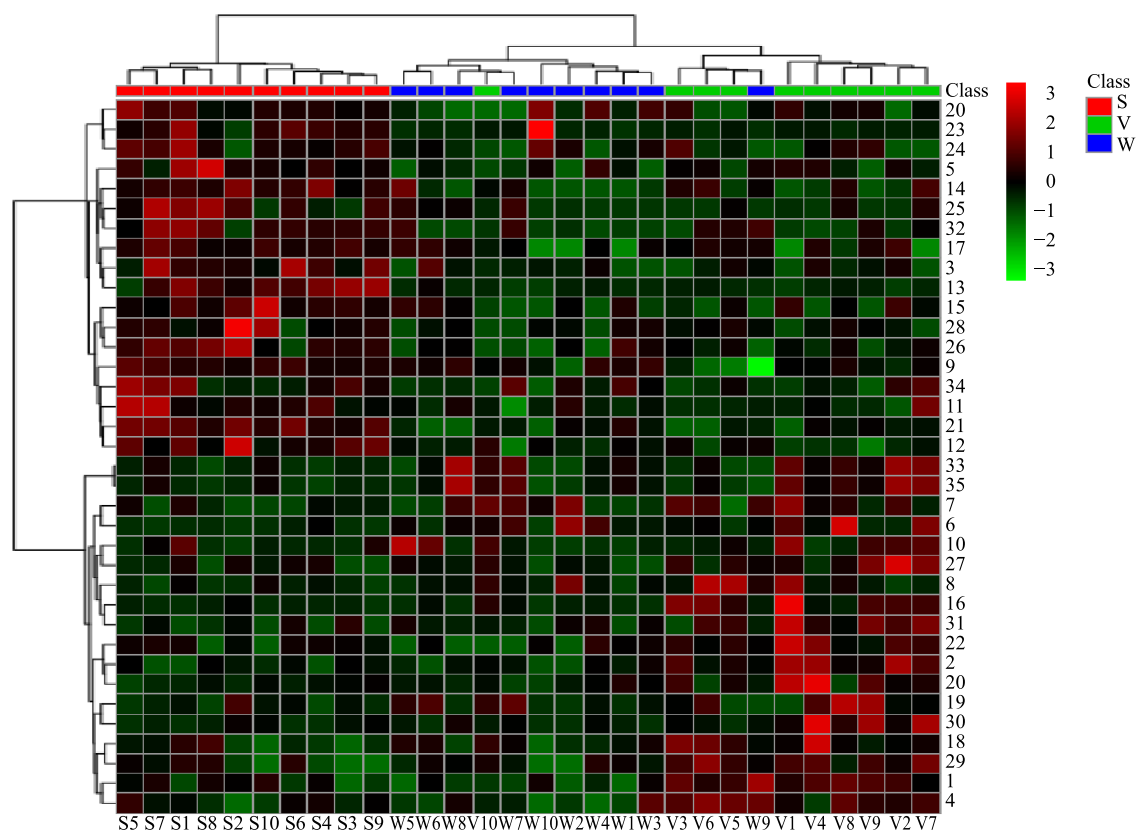


图 6 差异性代谢物的热分析

Fig. 6 Heatmap analysis of biomarker analysis

照组与其他 2 组分开，各组均不在一个分支下面，其中吴茱萸汤组与对照组最接近，说明吴茱萸汤对模型大鼠机体具调节与恢复作用。

3.6 血清代谢组学网络的构建及分析

疾病或生理过程是一个复杂的网络现象^[20-21]。代谢途径是细胞内发生的一系列化学变化，每一途径主要体现生物机体的某些功能，每一个小网络模块代表其发挥药效的功能单元，寻找潜在的生物标记物是代谢网络的一大特点，模块越复杂，网络规模越完善^[22]。将 35 个差异性代谢物导入 Cytoscape 3.3.0 中，通过 MetScape 模块化分析中发现共有 7 个模块，如图 7 所示，中心圆模块与其他 6 个模块联系最为紧密，中心圆模块中的潜在靶点有月桂酸、十四烷酸、马尿酸、7-脱氢胆固醇、肌酸、胆酸、葡萄糖内酯、 α -亚麻酸、富马酸、肌氨酸、苯甲酸、谷氨酸、脱氧胆酸；其中焦谷氨酸、花生四烯酸、异柠檬酸、三酰甘油、5-羟基色胺连线分别有 5、25、14、3、3 条。说明花生四烯酸与之中心模块关系最紧密，异柠檬酸次之。

4 讨论

在本研究中，许多差异性代谢物与能量代谢密

切相关。模型组中葡萄糖内酯、三酰甘油、肌酸升高，肌酐降低。葡萄糖内酯是生物体内新陈代谢不可缺少的重要物质之一。肌酐和肌酸之间可以相互转化，当机体需要大量能量时则释放出 ATP^[23]。机体长期供能不足，肌酸消耗增加，而肌酸合成缓慢，导致肌酸合成不足，模型组中肌酐含量降低，肌酸、葡萄糖内酯含量升高。说明机体功能不足导致肌酸合成受阻。三酰甘油在能量代谢中起着至关重要的作用。研究表明，感染和炎症反应可诱导脂质和脂蛋白代谢的显著性变化，包括血清脂肪酸、三酰甘油含量的增加^[24-26]。这与课题组前期研究发现虚寒呕吐大鼠体质量、饮食量下降和血清三酰甘油升高相一致，说明大鼠体内能量代谢紊乱，吴茱萸汤组大鼠葡萄糖内酯、三酰甘油、肌酐、肌酸均有不同程度的回调，说明吴茱萸汤能改善机体能量不足。

在差异性代谢物中，与氨基酸代谢有关的化合物有亮氨酸、5-羟基色胺等。亮氨酸为支链氨基酸 (BCAA)，BCAA 可以缓解肌肉的分解^[27-28]。亮氨酸对于机体中肌肉蛋白的合成、骨骼肌微细损伤的修复、糖异生、骨骼肌葡萄糖的摄取等方面都起着重要的调节作用^[29]。与对照组相比，模型组大鼠血

- 药研究的新策略 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 569-576.
- [10] Xie W P, Zhang W P, Ren J, *et al.* Metabonomics indicates inhibition of fatty acid synthesis, beta-oxidation and the TCA cycle in triclocarban-induced cardiac metabolic alterations in male mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1533-1542.
- [11] Zhou L L, Zhang W P, Chen H M, *et al.* Short-term effects of tributyl phosphate exposure on the metabolism of liver and susceptibility to hepatic encephalopathy in male mice [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 603(604): 77-85.
- [12] Shen G L, Zhou L L, Liu W, *et al.* Di(2-ethylhexyl)-phthalate alters the synthesis and β -oxidation of fatty acids and hinders ATP supply in mouse testes via UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS-based metabonomics study [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(24): 5056-5063.
- [13] 姬海南, 杜新亮, 孟 晶, 等. 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.
- [14] Wishart D S, Tzur D, Knox C, *et al.* HMDB: The human metabolome database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(3): 521-526.
- [15] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [16] Kanehisa M, Araki M, Goto S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(1): 480-484.
- [17] Steuer R, Kurths J, Fiehn O, *et al.* Observing and interpreting correlations in metabolomic networks [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(10): 1019-1026.
- [18] Li Y, Song X, Zhao X, *et al.* 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): 147-153.
- [19] Hornberg J J, Bruggeman F J, Westerhoff H V, *et al.* Cancer: A systems biology disease [J]. *Biosystems*, 2006, 83(2/3): 81-90.
- [20] Wu H, Xue R Y, Tang Z Q, *et al.* Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(4): 1385-1395.
- [21] Li Y, Song X, Zhao X, *et al.* 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.
- [22] Csérmely P, Söti C, Blatch G L, *et al.* Chaperones as parts of cellular networks [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 594(8): 55-63.
- [23] Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(3): 1107-1213.
- [24] Khovidhunkit W, Memon R A, Feingold K R, *et al.* Infection and inflammation induced proatherogenic changes of lipoproteins [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(23): S5462-S5472.
- [25] Khovidhunkit W, Kim M S, Memon R A. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: Mechanisms and consequences to the host [J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(7): 1169-1196.
- [26] Yuen K C, Biller B M, Molitch M E, *et al.* 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]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8): 2702-2707.
- [27] 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.
- [28] 张 庆, 漆正堂, 丁树哲. 亮氨酸及其代谢产物促进蛋白质合成的分子机制及其补充效果 [J]. 生命的化学, 2009, 29(1): 103-107.
- [29] 邹忠杰, 龚梦鹃, 王淑美. 双黄连口服液抗炎作用的代谢组学研究 [J]. 中成药, 2013, 35(1): 15-19.
- [30] 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.
- [31] Kure I, Nishiumi S, Nishitani Y, *et al.* 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.
- [32] Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and Disease [J]. *Reprod Nutr Dev*, 2004, 44(3): 273-282.
- [33] 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.