

热性中药附子调节机体内源性代谢产物的分子作用机制研究

马茜茜, 王春茜, 杨秀娟, 吴 茵, 王朋倩, 张 淼, 霍海如, 隋 峰*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 采用代谢组学技术观察附子 *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* 对小鼠血清内源性代谢物的影响, 寻找其相关生物标志物和可能表征附子临床治疗作用的代谢途径及相关靶点, 探讨其发挥疗效的分子机制。 **方法** 将 20 只雄性小鼠随机分为 2 组, 分别 ig 附子水煎液和蒸馏水, 小鼠给药量为 15 mL/(kg·d), 连续 ig 4 d; 采集各组血样, 利用 UPLC-MS/MS 技术进行分析, 主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 等分析方法进行数据模式识别, 并根据变异权重系数 (VIP) 大于 1 和手动积分计算筛选出差异代谢物; 利用差异代谢物进行通路分析; 运用 Cytoscape 和 MetScape 对差异代谢物进行网络模块化分析并筛选靶标。 **结果** 通过数据模式识别, 附子组与对照组均能完全分离; 共筛选出 18 个差异代谢物, 其含量都呈上调趋势; 通过通路分析, 得出 5 条相关通路, 分别为亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、烟酸和烟酰胺代谢和磷酸肌醇代谢通路; 网络模块化分析共得到 14 个模块, 其中最大的 2 个模块是花生四烯酸代谢通路和亚油酸代谢通路; 在整个网络中, 花生四烯酸 (59)、亚油酸 (55)、烟酰胺 (26) 和棕榈酸 (11) 节点度值大于均值 (8.010), 涉及的通路分别为花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢和饱和脂肪酸 β -氧化通路; 共筛选出 26 个相关基因, 同属于细胞色素 P450 (CYP450) 酶系。 **结论** 附子可能通过作用于 CYP450, 影响花生四烯酸代谢等途径, 进而调节机体能量代谢, 从而发挥临床治疗作用。

关键词: 附子; 内源性代谢产物; 代谢组学; 花生四烯酸代谢; 细胞色素 P450

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)24-6269-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.016

Exploration on molecular mechanism of hot herb *Aconitum carmichaelii* for therapeutic action based on metabolomics

MA Qian-qian, WANG Chun-qian, YANG Xiu-juan, WU Yin, WANG Peng-qian, ZHANG Miao, HUO Hai-ru, SUI Feng

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

Abstract: Objective To observe the effects of *Aconitum carmichaelii* on serum metabolites in mice by metabolomics technology, and to explore biomarkers and metabolic pathways and targets related to its treatment of various ailments such as cardiovascular diseases, in order to uncover its molecular mechanism of efficacy. **Methods** Twenty male mice were randomly divided into two groups, and *A. carmichaelii* decoction and distilled water were orally administered with the dose of 15 mL/(kg·d) for consecutive 4 d respectively. Collected blood samples of each group were analyzed using UPLC-MS/MS technology, and data pattern recognition was performed using PCA, PLS-DA and other analytical methods. Meanwhile, differential metabolites were screened out based on VIP greater than 1 and manual integral calculation. The differential metabolites were used for pathway analysis. Network modular analysis and targets screening were performed by Cytoscape and MetScape. **Results** When performing data pattern recognition, the aconite group and the control group could be completely separated. A total of 18 differential metabolites were screened out, and their contents were up-regulated. Pathway analysis was performed to obtain five related pathways, namely linoleic acid metabolism, arachidonic acid metabolism, starch and sucrose metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, and inositol phosphate metabolism. Fourteen modules were obtained using the network analysis, the largest two of which were arachidonic acid metabolism pathway and linoleic acid metabolism pathway. The degree of arachidonic acid (59), linoleic acid (55), nicotinamide (26), and palmitic acid (11) were

收稿日期: 2020-05-29

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); 国家自然科学基金面上项目 (81473372); 国家自然科学基金面上项目 (81373986); 国家自然科学基金青年项目 (81903819); 北京市自然科学基金项目 (7202143); 中国中医科学院传承项目 (KT18002ZX)

作者简介: 马茜茜, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (010)64041008 E-mail: 2311583509@qq.com

***通信作者** 隋 峰, 男, 研究员, 从事中药药性和药理研究。Tel: (010)64041008 E-mail: suifeng2136@126.com

greater than the mean value (8.010) in the network, and the related pathways were arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, and saturated fatty acid beta-oxidation pathway respectively. A total of 26 genes were screened out, all of which belonged to the cytochrome P450 enzyme system. **Conclusion** *A. carmichaelii* may affect arachidonic acid metabolism by acting on CYP450, thereby improving the body's energy metabolism and producing therapeutic effects.

Key words: *Aconitum carmichaelii* Debx.; endogenous metabolites; metabolomics; arachidonic acid metabolism; CYP450

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx 的侧根, 性热、味辛, 首载于《神农本草经》, 具有回阳、逐冷、祛风湿等作用, 是临床常用中药, 主要用于大汗亡阳、四肢厥逆、霍乱转筋、肾阳衰弱的腰膝冷痛、形寒爱冷、精神不振以及风寒湿痛、脚气等病症的治疗。近年的现代研究发现其对心血管病的治疗作用显著、疗效明确, 但其确切的分子作用机制目前尚未得以揭示^[1-2]。代谢组学是从整体上对生物体内代谢物的动态变化进行分析研究的现代生物学分析技术^[3], 与中药多组分、多靶点、多效应的作用特点和整合作用的治疗特征不谋而合, 是研究中药对机体产生变化的重要现代化手段。本实验在以往对辛热中药药性、药效评价的基础上, 利用 UPLC-MS/MS 组学技术分析典型的热性中药附子干预小鼠后的内源性血清代谢物变化, 寻找可能表征附子性效相关的代谢途径及相关靶点, 进而阐释其治疗心血管疾病可能的分子机制。

1 材料

1.1 药材

附子饮片购买于北京同仁堂, 经中国中医科学院中药研究所生药室鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品, 符合《中国药典》2015 年版的相关规定。

1.2 仪器与试剂

DIONEX Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (Thermo Fisher 公司); Thermo Q EXACTIVE 质谱仪 (Thermo Fisher 公司); C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Thermo Synchronis 公司); BSA223S 型电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); Milli-Q AdvantageA10 型超纯水仪 (Millipore 公司); 电子天平 (Mettler Toledo 公司); DW-HL388 型-80℃超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限责任公司); BCD-320D11D 型冰箱 (信科龙电器股份有限公司); 5402 型冷冻离心机 (Eppendorf 公司); KQ-250 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 甲醇 (色谱级, 批号 152469)、乙腈 (色谱级, 批号 136376)、甲酸 (色谱级, 批号 152469)、甲酸

铵 (色谱级, 批号 152469) 均购于 Thermo Fisher 公司; 超纯水 (屈臣氏集团)。

1.3 实验动物

雄性昆明小鼠 20 只, 体质量为 18~22 g, 购买于军事医学科学院。动物许可证号为 SCXK- (军) 2012-0004。实验小鼠适应性饲养 7 d 后进行正式实验。

1.4 数据库及软件

Metlin^[4] 数据库 (<http://metlin.scripps.edu/>); HMDB^[5] 数据库 (<https://www.hmdb.ca/>); KEGG^[6-7] 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/ligand.html>); Mzcloud 数据库 (<https://www.mzcloud.org/>); MetaboAnalyst 4.0^[8] 数据库 (<https://www.metaboanalyst.ca/>); Cytoscape v 3.7.0^[9] 软件 (<https://www.cytoscape.org/>); MetScape^[10] 插件 (<http://apps.cytoscape.org/apps/metscape>); Trace Finder 软件。

2 方法

2.1 中药制备

将小鼠用药剂量按照公式进行折算, 然后用电子天平称取一定量的附子饮片后倒入烧杯中, 加蒸馏水浸泡 (用量为浓缩后药液的 10 倍量体积), 时间为 30 min。然后倒入锅中, 进行煎煮。一煎: 先用武火煮至锅中水沸腾, 再用文火煎煮 1.5 h 后, 使用纱布滤过; 二煎方法与一煎相同, 煮沸后, 文火煎煮 0.5 h, 合并 2 次煎液, 再用文火浓缩至质量浓度为 0.15 g/mL。附子为有毒中药, 煎煮过程中加入适量开水, 以保证其药效及减小毒副作用。

小鼠用药剂量=9.01×成人用药剂量

2.2 动物分组及给药

将 20 只雄性小鼠进行随机分为 2 组, 每组 10 只, 分别为附子组和对照组, 每组进行编号。连续 ig 给药 4 d, 小鼠给药量为 15 mL/(kg·d), 对照组 ig 蒸馏水 15 mL/(kg·d)。

2.3 血样采集与处理

小鼠给药结束后, 进行眼球取血, 采集其血样于 1.5 mL EP 管中。将采集到的血样 4℃冰箱静置 2 h, 然后在 4℃条件下, 以 12 000 r/min 的速度离

心 10 min, 离心后的血清在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻保存。分析前, 将冷冻的小鼠血清取出, 室温解冻, 从每个血清样品中取 $50\text{ }\mu\text{L}$, 加入沉淀剂甲醇-乙腈 (1:1) $450\text{ }\mu\text{L}$, 涡旋 30 s, 然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 的速度离心 10 min, 取其上清液, 直接进样分析。

2.4 UPLC-MS/MS 分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Synchronis C_{18} 色谱柱 ($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$), 流动相组成为水 (含 0.1% 甲酸及 2 mmol/L 甲酸铵, A) -乙腈 (B)。梯度洗脱, 洗脱时间为 $0\sim 35\text{ min}$, 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$, 体积流量为 0.3 mL/min 。流动相梯度洗脱条件为: $0\sim 1.00\text{ min}$, $95\%\text{ A}$; $1.00\sim 25.00\text{ min}$, $95\%\sim 5\%\text{ A}$; $25.00\sim 30.00\text{ min}$, $5\%\text{ A}$; $30.00\sim 30.01\text{ min}$, $5\%\sim 95\%\text{ A}$; $30.01\sim 35.00\text{ min}$, $95\%\text{ A}$ 。

2.4.2 质谱条件 采用 ESI 离子源正、负离子同时扫描模式; 电喷雾电压为 $2\text{ }800\text{ V}$; 鞘气体积流量为 10.5 L/min ; 辅助气体流量为 3 L/min ; 毛细管温度为 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$; 一级全扫描分辨率为 70 k , 扫描范围 m/z : $50\sim 1\text{ }000$; 二级数据依赖性扫描分辨率为 17.5 k ; Stepped NCE 值分别为 20 、 40 、 60 V 。

2.5 数据分析

将上述所得的小鼠血清内源性代谢物的分子式和相对分子质量在 Mzcloud 数据库中进行鉴定, 同时利用 Trace Finder 自行建立代谢物数据库进行识别。再利用 Metlin、HMDB、KEGG 等数据库进行

检索并多次确认。在 MetaboAnalyst 4.0 中利用多种分析方法 (PCA、PLS-DA 及高通量代谢通路分析) 进行分析。最后在 Cytoscape v 3.7.0 中利用 MetScape 绘制代谢网络图进行模块化分析和靶点筛选。

3 结果

3.1 一般情况

在整个实验过程中, 对照组小鼠状态、饮食、大小便及行为活动等均无明显变化。小鼠 ig 附子水煎液后, 整体状态良好, 毛发正常, 和对照组相比, 并无显著性变化。随着给药时间的延长, 附子组小鼠水摄入量增加, 大便质地变硬, 尿液颜色发生变化, 活动量增加。各组小鼠状态持续至给药结束。

3.2 代谢物鉴别方式

在 Mzcloud 数据库中对小鼠血清内源性代谢物的分子式和相对分子质量进行鉴定识别, 再利用多个数据库进行峰比对并多次确认。在正、负离子任意模式下, 对应出峰时间, 根据相应的离子碎片鉴别代谢物。如图 1 所示, 以正离子模式下的缬氨酸为例确定内源性物质。图 1-A 中分别为正、负离子模式图, 图 1-B 是正离子模式下缬氨酸的色谱峰, 图 1-C 是正离子模式下缬氨酸所对应的离子碎片。

3.3 2 组小鼠血清比较分析

3.3.1 血清 UPLC-MS/MS 数据模式识别 附子组与对照组小鼠血清样品分别进行 PCA、PLS-DA 分析方法对比分析, 选择 Pareto 模式为其数据处理方

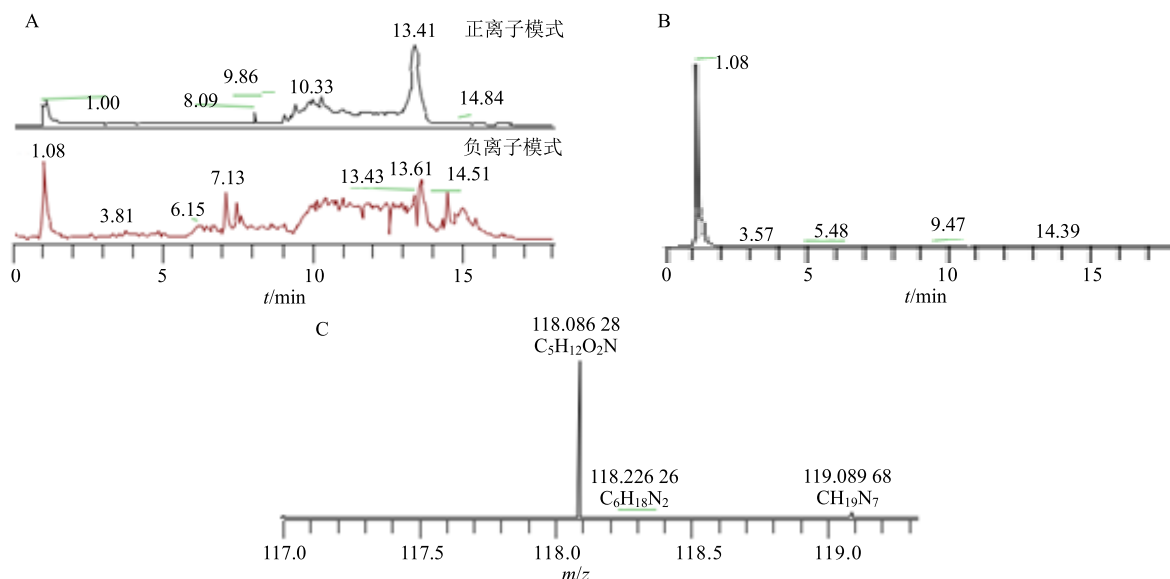


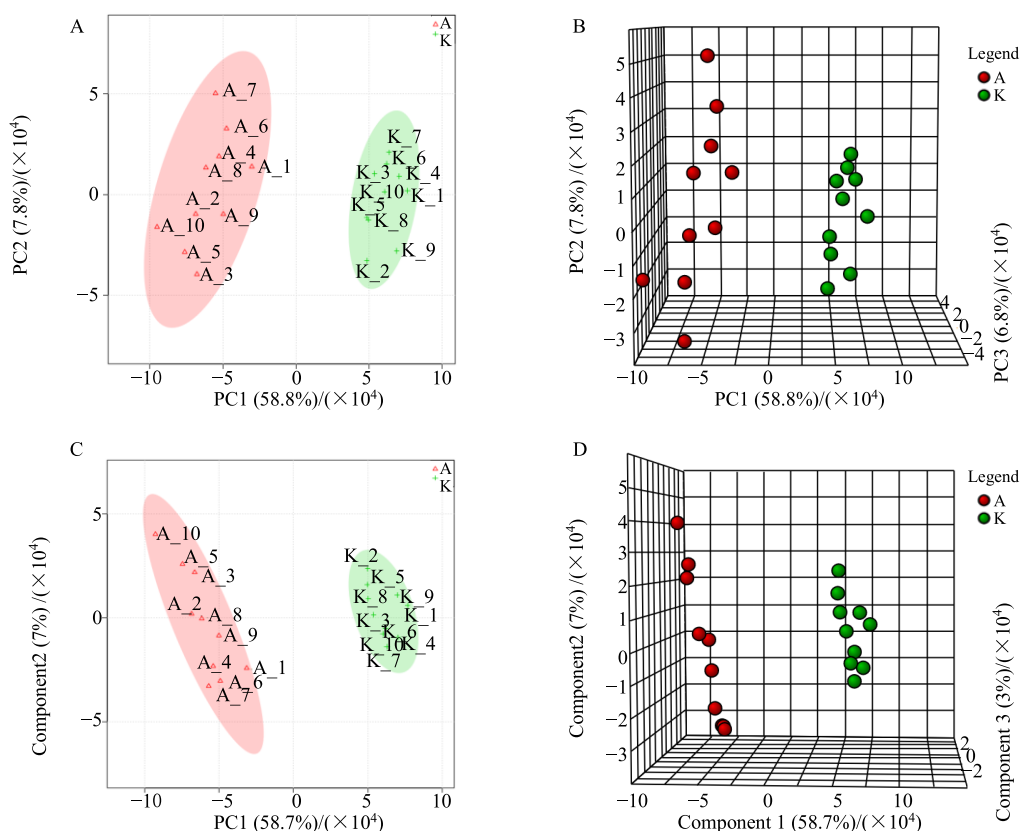
图 1 总离子流图 (A) 及缬氨酸鉴别过程图 (B、C)

Fig. 1 Total ion current diagram (A) and valine identification process diagram (B and C)

法。如图 2 所示, 对照组 (K) 用绿色表示, 附子组 (A) 用红色表示。

首先将对照组与附子组进行 PCA 分析, 如图 2-A、2-B 所示, 可以看出, 对照组和附子组样本分别有一定的聚集成群的趋势, 并且 2 组样本能够较

好地分离开来, 说明在附子的干预下, 小鼠体内代谢物发生了明显变化。利用 PLS-DA 分析方法对 2 组血清数据进行模式识别, 如图 2-C、2-D 所示, 可见对照组和附子组在有监督的情况下聚集性更强, 而且 2 组样本更能有效分离。



对照组与附子组 PCA 2D 得分图 B-对照组与附子组 PCA 3D 得分图 C-对照组与附子组 PLS-DA 2D 得分图 D-对照组与附子组 PLS-DA 3D 得分图

A-PCA 2D score chart of control group and aconite group B-PCA 3D score chart of control group and aconite group C-PLS-DA 2D score chart of control group and aconite group D-PLS-DA 3D score chart of control group and aconite group

图 2 附子组与对照组血清 UPLC-MS/MS 数据模式识别

Fig. 2 Pattern recognition of serum UPLC-MS/MS data between aconite group and control group

3.3.2 差异代谢物筛选 经过“3.3.1”项中数据模式识别分析方法分析, 可列出 20 (样本) × 184 (变量) 的矩阵。采用 PLS-DA 分析, 得到 5 种算法计算后的小鼠血清代谢物的变异权重系数 (VIP) 值表, 筛选出 5 种算法下均满足 $VIP > 1$ 的差异代谢物共有 21 个。将矩阵列为 20 (样本) × 21 (变量), 再进行 t 检验手动积分进一步筛选。最终, 确定附子组与对照组对比后 18 个变量可作为差异代谢物。结果见表 1、2。

3.4 代谢通路分析

对以上分析方法筛选出的差异代谢物进行高通

量代谢通路分析, 结果如表 3、图 3 所示, 同一代谢通路中的全部代谢物数量用 Total 表示; 差异代谢物在同一代谢通路中出现的个数用 Hits 表示; 在通路分析中计算的原始 P 值用 Raw p 表示。Impact 值大于 0.10 的代谢通路表示该通路可能与潜在的靶标路径紧密相关。根据分析结果, 共得出 5 条相关通路, 分别为亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、烟酸和烟酰胺代谢、磷酸肌醇代谢通路。

3.5 代谢组学网络构建及分析

在 Cytoscape v 3.7.0 软件中利用 MetScape 插件构建附子组与对照组比较得到的差异代谢物的相关

表 1 附子组 18 个差异代谢物的峰面积相对含量

Table 1 Relative contents of 18 differential metabolites in aconite group

代谢物	A	K	A/K
尿素	15.39±0.22	0.03±0.77**	513 ↑
亚油酸	1.88±0.19	0.68±0.15**	2.76 ↑
L-缬氨酸	1.22±0.27	0.61±0.12**	2.00 ↑
甜菜碱	1.20±0.28	0.62±0.11**	1.94 ↑
二十二碳六烯酸	1.21±0.20	0.79±0.16**	1.53 ↑
胆固醇硫酸酯	5.62±0.21	2.13±0.24**	2.64 ↑
硬脂酸	6.57±0.12	4.42±0.08**	1.49 ↑
棕榈酸	1.03±0.16	0.79±0.07**	1.30 ↑
反式油酸	9.58±0.17	7.15±0.08**	1.34 ↑
油酸	9.58±0.17	7.16±0.07**	1.34 ↑
花生四烯酸	6.28±0.12	4.30±0.23**	1.46 ↑
对羟基苯甲酸	1.18±0.37	0.14±0.41**	8.43 ↑
二十碳五烯酸	1.87±1.06	0.54±0.55**	3.46 ↑
葡萄糖	3.12±0.09	2.32±0.25**	1.34 ↑
肌醇	3.12±0.09	2.33±0.25**	1.34 ↑
烟酰胺	1.73±0.32	1.04±0.13**	1.66 ↑
γ-亚麻酸	1.07±0.20	0.50±0.13**	2.14 ↑
棕榈烯酸	8.35±0.35	2.28±0.36**	3.66 ↑

与对照组 (A) 相比: ** $P < 0.01$; ↑ 表示上调** $P < 0.01$ vs control group (A); ↑ means up

表 2 附子组 18 个差异代谢物信息

Table 2 Information of 18 differential metabolites in aconite group

代谢物	t/min	相对分子质量	分子式	KEGG 编号
尿素	1.39	60.032 4	CH ₄ N ₂ O	C00086
亚油酸	10.33	280.240 2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C01595
L-缬氨酸	1.19	117.079 0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	C00183
甜菜碱	1.44	117.079 0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	C00719
二十二碳六烯酸	9.35	328.240 2	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	C06429
胆固醇硫酸酯	9.64	466.311 7	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	C18043
硬脂酸	12.66	284.271 5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C01530
棕榈酸	11.30	256.240 2	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C00249
反式油酸	11.01	282.255 9	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C01712
油酸	11.01	282.255 9	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C00712
花生四烯酸	9.52	304.240 2	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	C00219
对羟基苯甲酸	5.80	138.031 7	C ₇ H ₆ O ₃	C00156
二十碳五烯酸	9.04	302.224 6	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	C06428
葡萄糖	1.06	180.063 4	C ₆ H ₁₂ O ₆	C00031
肌醇	1.36	180.063 4	C ₆ H ₁₂ O ₆	C00137
烟酰胺	1.35	122.048 0	C ₆ H ₆ N ₂ O	C00153
γ-亚麻酸	9.87	278.224 6	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C06426
棕榈烯酸	10.36	254.224 6	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	C08362

表 3 相关通路分析结果

Table 3 Analysis results of related pathways

编号	通路	总代谢物数	匹配数	Raw p
1	linoleic acid metabolism	5	1	0.055 253
2	arachidonic acid metabolism	36	1	0.338 69
3	starch and sucrose metabolism	15	1	0.157 25
4	nicotinate and nicotinamide metabolism	15	1	0.157 25
5	inositol phosphate metabolism	30	1	0.291 01

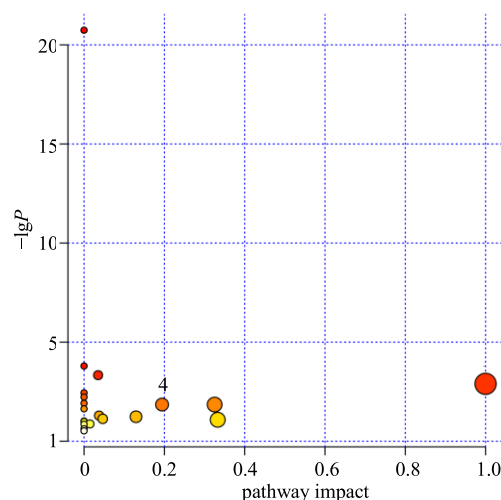


图 3 附子组中差异代谢物的相关代谢通路

Fig. 3 Related metabolic pathways of differential metabolites in aconite group

代谢网络 (图 4)。在构建得到的代谢组学网络图中, 总共可细分为 14 个相关网络模块, 其中花生四烯酸代谢通路和亚油酸代谢通路是整个网络中最大的模块。在该网络图中, 深色六边形表示代谢通路中本研究得到的差异代谢物, 浅色六边形表示此通路中的其他代谢物, 圆形代表相关靶点, 边代表它们之前的相互关系。对此代谢组学网络进行拓扑分析, 参数如表 4 所示。根据其拓扑参数可知该网络中每个基因或代谢物的直接邻居数均值为 8.010, 表明每个基因或代谢物的节点度均值为 8.010。在整个网络中, 差异代谢物节点度值大于均值的有 4 个, 分别为花生四烯酸 (59)、亚油酸 (55)、烟酰胺 (26) 和棕榈酸 (11)。节点度值越大, 表明其对整个网络的影响越大^[11]。以上 4 个差异代谢物在所构建的代谢通路中分别作用于花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、饱和脂肪酸 β-氧化通路, 且这

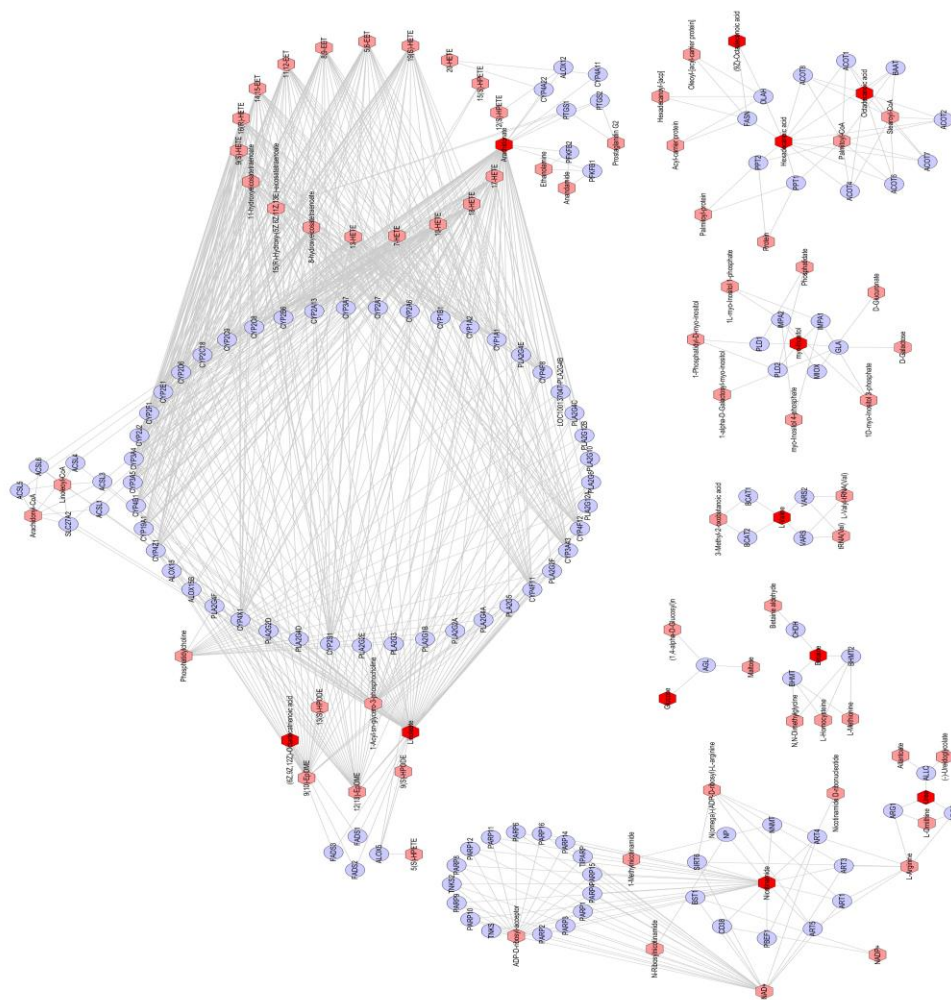


图 4 代谢组学网络模块

Fig. 4 Metabolomics network module

表 4 代谢网络拓扑参数

Table 4 Topological parameters of metabolic network

参数	参数值	参数	参数值
聚类系数	0.0	节点数	193
连通分量	7	边数	580
网络直径	8	网络密度	0.042
网络半径	1	网络异构性	1.176
网络中心势	0.268	孤立节点	0
最短路径	11 406 (30%)	自循环数	0
特征路径长度	2.467	多边节点对	0
平均邻居数	8.010	—	—

4 个通路模块在网络中占比也最大。其中花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢通路和“3.4”项中构建的代谢通路分析结果一致。

3.6 靶点预测及分析

将代谢组学网络模块图中相关基因进行分析筛

选, 其中高于平均节点度的基因有 26 个(表 5)。分析可知, 这 26 个基因是网络图中最大两个模块的共有基因。在本研究中同时利用以下 3 种算法来衡量 26 个基因在整个网络中的重要性, 分别为度中心性、接近中心性和中介中心性算法, 见表 6。从表中可知, 26 个基因 3 个中心性值都相等, 表明其在整个网络中处于同等重要的地位。对这 26 个基因进行分析, 可知它们同属于细胞色素 P450 (CYP450) 超家族。因此, 附子可能是作用于 CYP450 从而引起小鼠体内代谢物的变化。

4 讨论

本实验利用代谢组学技术对小鼠给药附子后其血清代谢物变化进行分析,根据 PCA 和 PLS-DA 分析方法对小鼠血清数据模式识别,可以看到附子组能够与对照组完全分离,表明在附子的干预下,小

表 5 网络中度值大于平均值的基因

Table 5 Genes with degree value greater than average value in network

基因名称	度	基因名称	度
CYP1A1	18	CYP2A13	18
CYP1A2	18	CYP2A6	18
CYP1B1	18	CYP2A7	18
CYP3A4	18	CYP2B6	18
CYP3A43	18	CYP2C18	18
CYP3A5	18	CYP2C8	18
CYP3A7	18	CYP2C9	18
CYP4B1	18	CYP2D6	18
CYP4F11	18	CYP2E1	18
CYP4F12	18	CYP2F1	18
CYP4F8	18	CYP2J2	18
CYP4X1	18	CYP2S1	18
CYP4Z1	18	CYP19A1	18

表 6 26 个基因中心性分析

Table 6 Centrality analysis of 26 genes

基因名称	度中心性值	接近中心性值	中介中心性值
CYP1A1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP1A2	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP1B1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2A13	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2A6	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2A7	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2B6	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2C18	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2C8	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2C9	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2D6	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2E1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2F1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2J2	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP2S1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP3A4	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP3A43	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP3A5	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP3A7	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4B1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4F11	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4F12	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4F8	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4X1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP4Z1	18	0.508 108 11	0.008 825 65
CYP19A1	18	0.508 108 11	0.008 825 65

鼠血清中代谢物的含量产生了显著变化。根据分析结果, 尿素、亚油酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、花生四烯酸、葡萄糖、肌醇、烟酰胺等 18 个代谢物可作为小鼠给药附子后的生物标志物, 且这些标志物在附子作用下, 都呈显著上调趋势, 这些标志物在机体蛋白质、糖类代谢或脂质代谢等代谢过程中发挥重要作用^[12-14], 表明附子通过上调小鼠机体内这些代谢物变化, 进而引起机体能量代谢增强, 与目前已报道的研究结果相符合^[15-16], 这可能与附子的温热药性相关。附子中含有生物碱类、多糖类、皂苷类等化学成分^[1-2, 17-19], 其中生物碱、多糖、尿嘧啶等作为附子的药效成分^[1-2, 19-21]可能是引起小鼠机体内源性代谢物变化, 增强机体能量代谢的药效物质基础。

根据通路富集分析和代谢网络分析结果, 花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢通路可作为附子作用于机体的主要代谢通路, 其中花生四烯酸代谢和亚油酸代谢涉及机体脂质代谢, 烟酸和烟酰胺代谢属于辅助因子和维生素的代谢, 三者对机体能量代谢非常重要。心血管疾病作为慢性病的一种, 在机体能量代谢方面存在障碍^[22-23]。附子作为温热药的典型代表, 在心血管疾病治疗方面疗效显著, 具有强心、抗心律失常、降血糖、调血脂、降血压等作用^[2], 故而附子发挥心血管治疗作用可能和提高机体能量代谢有关。

对代谢通路相关靶点分析, 得出 CYP450 可能是附子作用于机体的主要靶点。与花生四烯酸代谢密切相关的 CYP450 在心血管疾病的发生发展过程中可能发挥着重要作用^[24-25]。花生四烯酸在体内的 3 条代谢途径中, 其中脂氧化酶 (LOX) 途径和环氧合酶 (COX) 途径已有深入研究, 花生四烯酸在 LOX 途径中被转化为脂蛋白、白三烯等脂质介质^[26], 在 COX 途径中 COX-1 和 COX-2 亚型将其转化为前列腺素、前列环素或血栓素等^[27], 而 CYP450 途径作为花生四烯酸的第 3 代谢途径, 目前还在不断研究中^[28]。心脏中主要的 CYP 酶是 CYP2 家族的 CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 和 CYP4 家族的 CYP4A、CYP4F^[24], 花生四烯酸在 CYP 酶 (CYP2C 和 CYP2J2) 环氧化作用下, 生成环氧二十碳三烯酸化合物 (EETs), 这些产物对维持心脏功能有重要作用^[24, 28]; 花生四烯酸在 CYP 酶 (CYP4A 和 CYP4F11/CYP4F12) 羟化作用下, 产生羟基二十碳四烯酸化合物 (HETEs), 导致心脏功能障碍^[24, 28]。

因此, 附子中双酯型二萜生物碱的心脏毒性^[21]机制可能与以上 CYP450 作用相关。改变特异性 CYP450 环氧合酶和羟化酶的活性可能会影响 EETs 和 HETEs 与心血管效应之间的平衡。机体脂质代谢失调与炎症、肿瘤、糖尿病、神经退行性病变以及心血管疾病^[28]等疾病相关。据此, CYP450 的表达与心血管疾病(如高血压、心肌缺血和梗死、充血性心力衰竭和心律失常等)之间可能存在关联^[29-31]。能够促使机体内源性代谢物花生四烯酸产生心脏保护性 EETs 的 CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 和心脏毒性 HETEs 的 CYP4F11、CYP4F12 在本研究预测筛选到的 CYP450 中都可找到, 本实验筛选得到的 CYP2C8、CYP2C9 和 CYP2J2 可能是附子治疗心血管疾病的生物靶标, 但其具体的机制还需进一步实验研究。

参考文献

- [1] 周炜炜, 王朋倩, 戴 丽, 等. 辛热药附子调节心血管作用和机制研究进展 [J]. 中南药学, 2017, 15(5): 615-619.
- [2] Zhou G, Tang L, Zhou X, *et al.* A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 160: 173-193.
- [3] 吴昱铮, 王广基, 郝海平. 中药代谢组学研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 129-135.
- [4] Smith C A, O'Maille G, Want E J, *et al.* METLIN: a metabolite mass spectral database [J]. *Ther Drug Monit*, 2005, 27(6): 747-751.
- [5] Wishart D S, Tzur D, Knox C, *et al.* HMDB: The human metabolome database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: D521-D526.
- [6] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [7] Kanehisa M, Araki M, Goto S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: D480-D484.
- [8] Xia J, Wishart D S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, doi: 10.1002/cpbi.11.
- [9] 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.
- [10] Gao J, Tarcea V G, Karnovsky A, *et al.* Metscape: A Cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic data in the context of human metabolic networks [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7): 971-973.
- [11] 戴逸飞, 霍海如, 王朋倩, 等. 基于系统药理模式挖掘中药寒热药性的关键靶标和疾病网络 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 521-526.
- [12] Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(9): 732-744.
- [13] Shi X, Cheng Q, Xu L, *et al.* Cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase inhibit gluconeogenesis by targeting hepatocyte nuclear factor 4 α [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(3): 485-497.
- [14] Prah J, Winters A, Chaudhari K, *et al.* Cholesterol sulfate alters astrocyte metabolism and provides protection against oxidative stress [J]. *Brain Res*, 2019, 1723: 146378.
- [15] 马清翠, 于华芸, 赵 俭, 等. 附子、干姜、黄连、大黄对正常大鼠能量代谢的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(5): 379-380.
- [16] 于华芸, 季旭明, 吴智春, 等. 附子对大鼠能量代谢及相关基因表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2535-2538.
- [17] 舒晓燕, 侯大斌, 李 凤. 不同品种附子生物碱和多糖含量的比较 [J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2916-2918.
- [18] 张意涵, 杨昌林, 黄志芳, 等. 附子煎煮过程中 13 种生物碱含量的动态变化规律研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 16-23.
- [19] 唐 梅, 赵立春, 徐 敏, 等. 附子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [20] 黄灵珠, 黄 婷, 林 榕, 等. 附子多糖延缓心肌衰老的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(24): 2894-2896.
- [21] 谢晓芳, 彭 成. 附子心脏毒效的多维评价和整合分析研究进展 [J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 2555-2562.
- [22] 张宝月, 刘艾林, 杜冠华. 能量代谢紊乱对疾病的影响及其潜在药物靶点 [J]. 药学学报, 2019, 54(8): 1372-1381.
- [23] Rydén M, Arner P. Cardiovascular risk score is linked to subcutaneous adipocyte size and lipid metabolism [J]. *J Intern Med*, 2017, 282(3): 220-228.
- [24] Jamieson K L, Endo T, Darwesh A M, *et al.* Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 179: 47-83.
- [25] Imig J D. Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 192: 1-19.
- [26] Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoygenases and their biological relevance [J]. *Biochim*

- Biophys Acta*, 2015, 1851(4): 308-330.
- [27] Luo W, Liu B, Zhou Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 780: 148-158.
- [28] Drolet B, Pilote S, G  linas C, *et al.* Altered protein expression of cardiac CYP2J and hepatic CYP2C, CYP4A, and CYP4F in a mouse model of type II diabetes-A link in the onset and development of cardiovascular disease? [J]. *Pharmaceutics*, 2017, 9(4): 44.
- [29] Elbekai R H, El-Kadi A O. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(2): 564-587.
- [30] Yang L, Ni L, Duan Q, *et al.* CYP epoxygenase 2J2 prevents cardiac fibrosis by suppression of transmission of pro-inflammation from cardiomyocytes to macrophages [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015, 116/117: 64-75.
- [31] 赵钦烁. 细胞色素 P450 表氧化酶 2J2 及其代谢产物 EETs 改善心肌梗死后心功能及其机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.