

基于内源性代谢物探索吴茱萸辛热药性的生物学表征规律

许淑君, 孟 晶, 周炜炜, 王朋倩, 张 淼, 吴 茵, 杨秀娟, 隋 峰*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 基于代谢组学技术, 通过小鼠血清内源性代谢物的变化寻找吴茱萸发挥生物效应的代谢途径和有关靶点, 研究吴茱萸发挥疗效的分子机制。 **方法** 小鼠随机分为对照组和吴茱萸组, 给予吴茱萸进行干预, 采用超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术分析 2 组小鼠血样, 采用主成分分析、偏最小二乘判别分析、正交偏最小二乘判别分析等方法, 筛选差异代谢物并进行代谢通路分析; 使用 Cytoscape 及 Metscape 软件对差异代谢物进行网络模块化分析, 筛选可能的作用靶点。 **结果** 数据模式识别显示吴茱萸组与对照组血清样本完全分离; 共获得 13 个差异表达代谢物; 通路分析共获得 4 条通路; 网络模块化分析共获得 11 个模块, 其中花生四烯酸代谢通路和亚油酸代谢通路是最大的 2 个模块; 在整个模块中, 烟酰胺、花生四烯酸、棕榈酸、亚油酸节点度均大于均值, 涉及的通路包括烟酸和烟酰胺代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢及饱和脂肪酸 β -氧化; 通过筛选获得细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶系相关的 26 个基因。 **结论** 吴茱萸可能通过作用于 CYP450 酶系, 影响花生四烯酸、亚油酸、烟酸和烟酰胺等代谢途径, 调控机体能量代谢, 进而实现生物效应。

关键词: 吴茱萸; 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(2021)07-1994-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.017

Exploring biological characterization of “hot” pungent *Euodia rutaecarpa* based on endogenous metabolites

XU Shu-jun, MENG Jing, ZHOU Wei-wei, WANG Peng-qian, ZHANG Miao, WU Yin, YANG Xiu-juan, SUI Feng

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

Abstract: Objective To explore the pathways and targets evoked by Wuzhuyu (*Euodia rutaecarpa*) as well as the molecular mechanism related to its biological effect through the changes of endogenous metabolites. **Methods** Mice were randomly divided into control group and *E. rutaecarpa* group, *E. rutaecarpa* was given to intervene. The blood samples of two groups were analyzed by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The analysis methods such as principal component analysis, partial least squares discrimination analysis and orthogonal partial least squares discrimination analysis were selected to identify data patterns. Differential metabolites were screened according to VIP > 1 and manual integral calculation, and then the metabolic pathways analysis was performed. Cytoscape and Metascape software were used to establish the network modularization analysis of differential metabolites and screen possible targets. **Results** The result of data pattern recognition showed that serum sample of *E. rutaecarpa* group was completely separated from control group and 13 differential expressed metabolites were obtained. Four pathways were found by pathway analysis. Network modular analysis obtained 11 modules in total, among which arachidonic acid and linoleic acid metabolic pathway were the two largest modules. In the whole module, the node degrees of nicotinamide, arachidonic acid, palmitic acid and linoleic acid were all greater than the mean. The pathways involved nicotinic acid and nicotinamide metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism and saturated fatty acid β -oxidation. A total of 26 genes were screened out, all of which were belong to cytochrome P450 enzyme system. **Conclusion** *E.*

收稿日期: 2020-12-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873024); 国家自然科学基金青年项目 (81903819); 北京市自然科学基金资助项目 (7202143); 中国中医科学院传承项目 (KT18002ZX)

作者简介: 许淑君 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 18811022024 E-mail: 1419189744@qq.com

***通信作者:** 隋 峰, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药药性和药理。E-mail: suifeng2136@126.com

rutaecarpa may regulate energy metabolism and affect metabolic pathways of arachidonic acid, linoleic acid, nicotinic acid and nicotinamide by acting on cytochrome P450 enzymes to achieve biological effect.

Key words: *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; endogenous metabolites; metabolomics; arachidonic acid metabolism; cytochrome P450

中药药性理论是中医药理论体系的重要组成部分,四性五味是药性理论的核心内容。充分利用现代科技手段揭示中药性味理论的生物内涵对于实现中医药理论的客观化和标准化、提高中医药的临床诊治能力至关重要。吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1],是临床常用的典型辛热性中药,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效,主要用于治疗厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气等^[2-4]。课题组前期研究发现,调节机体能量代谢可能是辛热中药发挥生物效应、表征药性的关键环节和作用途径^[5]。为深入揭示其内在的分子机制,本研究借助代谢组学的相关技术和方法,以内源性代谢产物为主要指标,以吴茱萸为研究示例,通过给药前后小鼠血清中内源性代谢物的差异分析和比对研究,发现主要相关靶点和通路,解析其生物表征模式 and 特点,为全面揭示中药药性理论内涵提供依据。

1 材料

1.1 药材

吴茱萸购自北京同仁堂,经中国中医科学院中药资源中心袁庆军研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。

1.2 动物

清洁级雄性昆明种小鼠 20 只,4~5 周龄,体质量为 18~22 g,购自军事医学科学院,合格证号 SCXK-(军)2012-0004。动物饲养于动物房,温度(26±1)℃,自由饮食饮水,适应性饲养 7 d。动物实验遵循中国中医科学院中药研究所有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

1.3 试剂

色谱级甲酸(批号 152469)、色谱级甲酸铵(批号 152469)、色谱级甲醇(批号 152469)、色谱级乙腈(批号 136376)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超纯水购自屈臣氏集团。

1.4 仪器

电子天平(美国 Mettler Toledo 公司);BSA223S

型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);BCD-320D11D 型冰箱(信科龙电器股份有限公司);JIDI-16R 台式多用途高速冷冻离心机(广州吉迪仪器有限公司);DW-HL388 型-80℃超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司);Q EXACTIVE 质谱仪、DIONEX Ultimate3000 超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪(Millipore 公司);KQ-250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.5 数据库及软件

京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<https://www.genome.jp/kegg/ligand.html>)^[6-7];Metabo Analyst 4.0 数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)^[8];Metlin 数据库(<http://metlin.scripps.edu/>)^[9];Mzcloud 数据库(<https://www.mzcloud.org/>);HMDB 数据库(<https://www.hmdb.ca>)^[10];MetScape 插件(<http://apps.cytoscape.org/apps/metscape>)^[11];Cytoscape 3.7.0 软件(<https://www.cytoscape.org/>)^[12];Trace Finder 软件。

2 方法

2.1 吴茱萸水煎液的制备

称取吴茱萸,加入蒸馏水(用量为浓缩后药液体积的 10 倍量体积)浸泡 30 min 后,武火煮至药液沸腾,转用文火煎煮 30 min,用 8 层纱布滤过,重复煎煮 1 次。合并 2 次滤液,文火浓缩至药液质量浓度为 0.15 g/mL(以生药量计)。

2.2 动物分组与给药

小鼠随机分为对照组和吴茱萸(2.25 g/kg,相当于临床等效剂量)组,每组 10 只。吴茱萸组小鼠 ig 药物(15 mL/kg),对照组小鼠 ig 等体积蒸馏水,1 次/d,连续 4 d。

2.3 血样采集与处理

给药结束后,小鼠眼球取血,脱颈椎处死。血样于 4℃静置 2 h,4℃、11 985×g 离心 10 min,取上层血清,于-80℃保存备用^[13]。吸取 50 μL 血清,加入 450 μL 沉淀剂甲醇-乙腈(1:1),涡旋 30 s,4℃、11 985×g 离心 10 min,吸取上清液,进样分析。

2.4 UPLC-MS/MS 分析

2.4.1 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、2 mmol/L 甲酸铵的水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱: 0~1.00 min, 95% A; 1.00~25.00 min, 95%~5% A; 25.00~30.00 min, 5% A; 30.00~30.01 min, 5%~95% A; 30.01~35.00 min, 95% A; 进样量 5 μL; 体积流量 0.3 mL/min。

2.4.2 质谱条件 选择 ESI 离子源正、负离子同时扫描模式; 一级全扫描分辨率为 70 000, 扫描范围 m/z 50~1000; 二级数据依赖性扫描分辨率为 17 500; 鞘气体积流量为 10.5 L/min; 辅助气体流量为 3 L/min; 电喷雾电压为 2800 V; Stepped NCE 值分别为 20、40、60 V; 毛细管温度为 320 °C。

2.5 样品前处理

考察血清样品和沉淀剂 (1:3、1:6、1:9) 的比例关系, 结果显示血清样品与沉淀剂比例 1:9 效果最好, 适用于本研究中沉淀小鼠血清样品的蛋白杂质。

2.6 数据分析

在 Mzcloud 数据库中鉴别小鼠血清中内源性代

谢物的相对分子质量和分子式, 选择 Trace Finder 自行建立代谢物数据库, 进行峰对齐、保留时间校正、峰面积提取操作^[14]。利用 HMDB、KEGG、Metlin 等数据库对化合物信息进行检索和确认。使用 Metabo Analyst 4.0 中正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、聚类分析、高通量代谢通路分析等方法进行分析。通过 PLS-DA 模型筛选出变异权重系数 (VIP) >1 的离子, 结合单变量统计分析 $FC > 0.5$ 且 $P < 0.05$ 的限制条件, 找出差异性代谢物。利用 Cytoscape 3.7.0 软件中 MetScape 插件绘制代谢网络图, 预测靶点。

3 结果

3.1 代谢物鉴定方式

以缬氨酸为例鉴定内源性物质, 图 1-A 为正、负离子模式图, 图 1-B 为正离子模式下缬氨酸的色谱峰, 图 1-C 为正离子模式下缬氨酸色谱峰所对应的二级质谱。

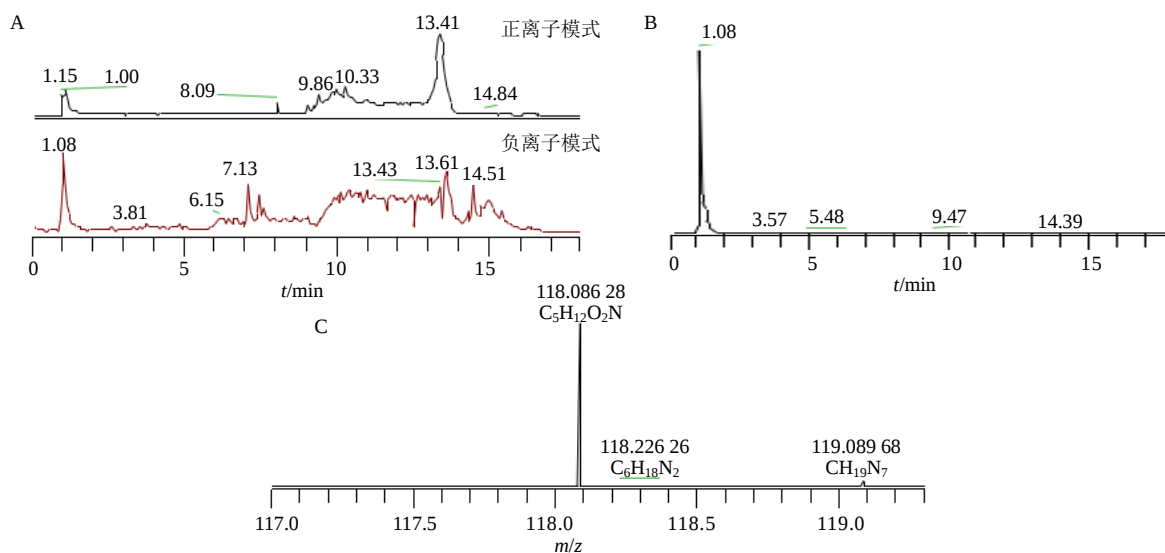


图 1 总离子流图 (A)、正离子模式下 1.08 min 出现的色谱峰 (B) 及其对应的母核离子碎片 (C)

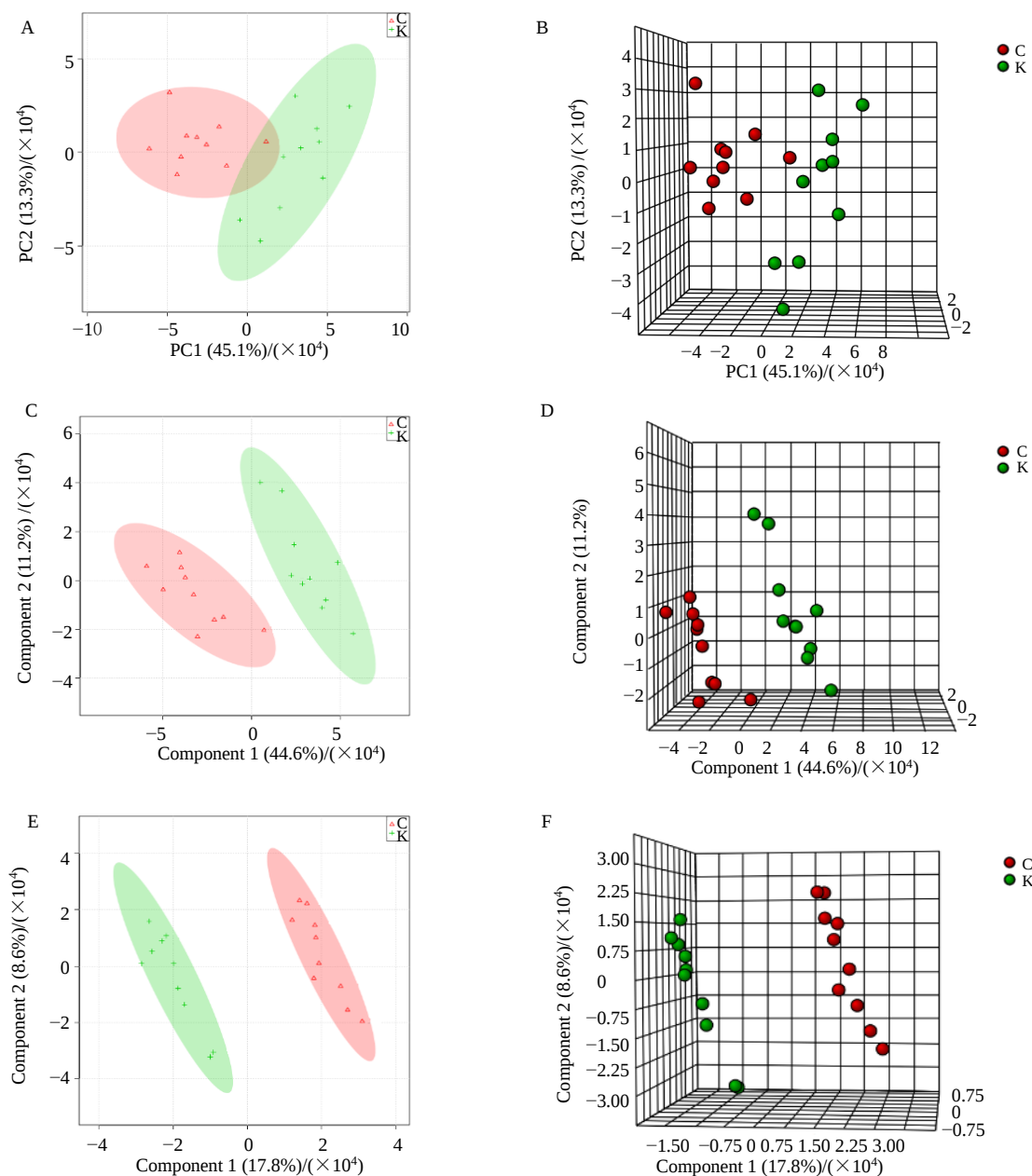
Fig. 1 Total ion current diagram (A), chromatographic peak (B) and corresponding to parent ion fragmentation (C) appeared at 1.08 min in positive ion mode

3.2 吴茱萸组与对照组小鼠血清比较分析

3.2.1 吴茱萸组与对照组血清 UPLC-MS/MS 数据模式识别 对吴茱萸组与对照组血清样本进行 PCA 分析, 结果如图 2-A、B 所示, 2 组血清样本表现一定的聚集趋势, 但未能完全分离。采用 PLS-DA 和 OPLS-DA 分析方法对吴茱萸组和对照

组小鼠血清样本数据展开模式识别, 结果如图 2-C~F 所示, 在有监督的情况下 2 组样本聚集性更强, 能够完全分离。OPLS-DA 分析方法能够更程度地体现 2 组样本的聚集性和分离性, 表明吴茱萸使小鼠内源性代谢产物产生了改变。

对 2 组数据进行聚类分析, 如图 3-A 所示, 从



K 和绿色代表对照组, C 和红色代表吴茱萸组, 下图同

K and green represent control group, C and red represent *E. rutaecarpa* group, same as belows

图 2 对照组与吴茱萸组血清样本的 PCA 2D 得分图 (A)、PCA 3D 得分图 (B)、PLS-DA 2D 得分图 (C)、PLS-DA 3D 得分图 (D)、OPLS-DA 2D 得分图 (E) 和 OPLS-DA 3D 得分图 (F)

Fig. 2 PCA 2D score chart (A), PCA 3D score chart (B), PLS-DA 2D score chart (C), PLS-DA 3D score chart (D), OPLS-DA 2D score chart (E), OPLS-DA 3D score chart (F) of serum sample in control group and *E. rutaecarpa* group

树状图可以看出, 吴茱萸组和对照组血清样本数据被完全聚集成不同的 2 类, 每组数据在其自身样本内部再进行细分。如图 3-B 所示, PLS-DA 分析发现 2 组样本中多个代谢物表现出显著差异。

3.2.2 吴茱萸组与对照组差异代谢物筛选 利用 PLS-DA 分析获得血清代谢物的 VIP 值表, 其中同

时满足 5 种算法计算方式且 $VIP > 1$ 的差异代谢物共有 21 个。设计 20 (样本) $\times$ 21 (变量) 的矩阵, 采用 t 检验手动积分进一步分析, 最终筛选得到 13 个差异代谢物, 结果见表 1、2。

3.3 代谢通路分析

对“3.2.2”项中筛选得到的 13 个差异代谢物展

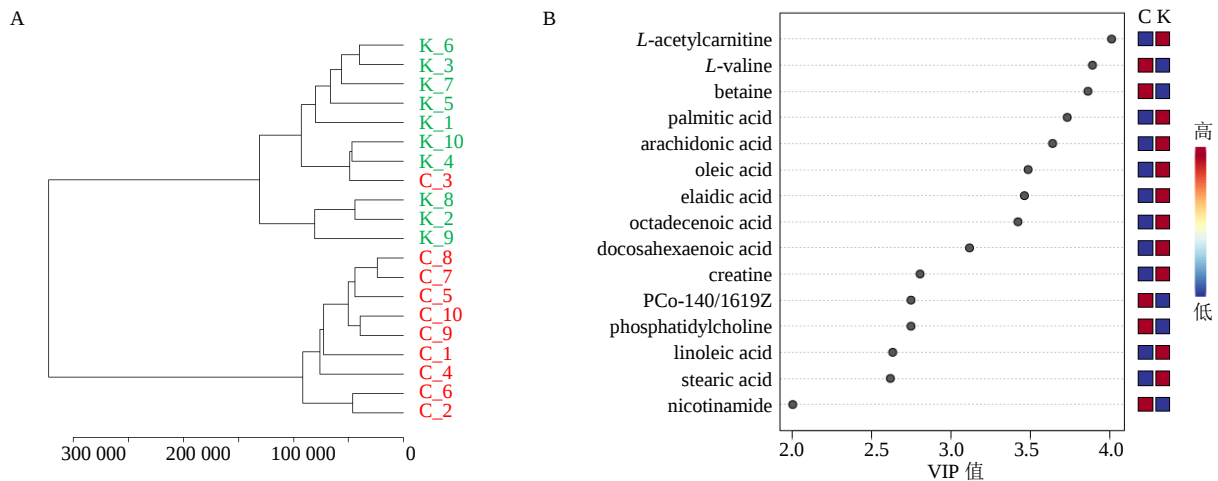


图 3 对照组和吴茱萸组血清样本聚类分析 (A) 及 VIP 大于 1 的部分代谢物 (B)

Fig. 3 Cluster analysis of control group and *E. rutaecarpa* group (A), partial metabolites with VIP greater than 1 (B)

表 1 吴茱萸组血清样本中 13 个差异代谢物的相对含量

Table 1 Relative contents of 13 differential metabolites in serum sample of *E. rutaecarpa* group

代谢物	相对含量		
	对照	吴茱萸	对照/吴茱萸
L-acetylcarnitine	6.50 ± 0.28	9.97 ± 0.39*	0.65 ↓
L-valine	8.35 ± 0.15	6.12 ± 0.12**	1.36 ↑
betaine	8.35 ± 0.15	6.15 ± 0.11**	1.36 ↑
arachidonic acid	2.37 ± 0.29	4.30 ± 0.23**	0.55 ↓
palmitic acid	6.12 ± 0.08	7.90 ± 0.07**	0.77 ↓
oleic acid	5.45 ± 0.16	7.16 ± 0.07**	0.76 ↓
elaidic acid	5.45 ± 0.16	7.15 ± 0.08**	0.76 ↓
creatine	1.65 ± 0.23	2.76 ± 0.20**	0.60 ↓
docosahexaenoic acid	6.07 ± 0.22	7.89 ± 0.16*	0.77 ↓
linoleic acid	5.42 ± 0.21	6.80 ± 0.15*	0.80 ↓
stearic acid	3.50 ± 0.09	4.42 ± 0.08**	0.79 ↓
β-hydroxybutyrate	1.38 ± 0.36	2.16 ± 0.34*	0.64 ↓
nicotinamide	1.59 ± 0.17	1.04 ± 0.13**	1.54 ↑

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; ↑ 表示上调, ↓ 表示下调* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ↑ means up, ↓ means down

表 2 吴茱萸组血清样本中 13 个差异代谢物信息

Table 2 Information of 13 differential metabolites in serum sample of *E. rutaecarpa* group

代谢物	t_R/min	相对分子质量	VIP	化学式	KEGG 编号
L-acetylcarnitine	1.192 199 7	203.238 0	3.948 1	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$	C02571
L-valine	1.191 229 6	117.079 0	3.829 6	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	C00183
betaine	1.435 121 0	117.079 0	3.801 5	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	C00719
arachidonic acid	9.522 714 9	304.240 2	3.582 7	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C00219
palmitic acid	11.303 449 0	256.240 2	3.673 3	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C00249
oleic acid	11.011 867 0	282.255 9	3.430 9	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	C00712
elaidic acid	11.011 867 0	282.255 9	3.408 2	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	C01712
creatine	1.182 447 5	131.069 5	2.762 1	$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	C00300
docosahexaenoic acid	9.352 906 9	328.240 2	3.068 5	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C06429
linoleic acid	10.334 693 0	280.240 2	2.592 7	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C01595
stearic acid	12.655 560 0	284.271 5	2.578 3	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	C01530
β-hydroxybutyrate	1.614 602 3	104.047 3	1.931 1	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$	C01089
nicotinamide	1.347 366 6	122.048 0	1.973 7	$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$	C00153

开高通量代谢通路分析, 结果见表 3 和图 4, 共获得 5 条相关代谢通路, 分别为花生四烯酸代谢通路、亚油酸代谢通路、烟酸和烟酰胺代谢通路、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路以及缬氨酸、亮氨酸和异

亮氨酸降解通路。

3.4 代谢组学网络构建及分析

吴茱萸组与对照组分析获得的 13 个差异代谢物的代谢组学网络模块图如图 5 所示, 该网络模块

表 3 13 个差异代谢物的相关通路分析

Table 3 Analysis of related pathways of 13 differential metabolites

通路	全部代谢物数目	差异代谢物数目	P 值	影响力
亚油酸代谢通路	5	1	0.042 477	1
花生四烯酸代谢通路	36	1	0.270 800	0.332 92
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路	34	1	0.033 032	0.046 95
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路	40	1	0.296 280	0
烟酸和烟酰胺代谢通路	15	1	0.119 190	0.194 30

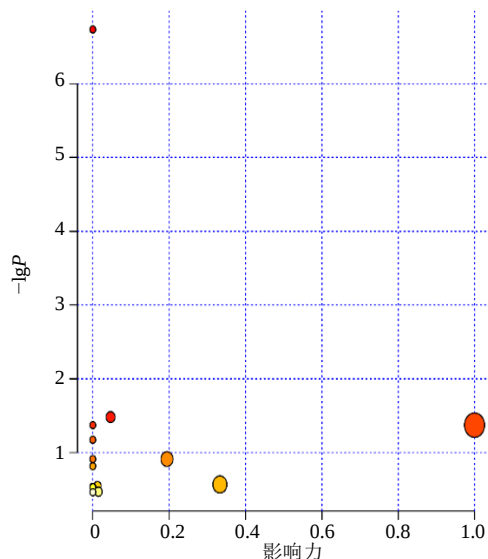


图 4 吴茱萸组中 13 个差异代谢物的相关代谢通路

Fig. 4 Related metabolic pathways of 13 differential metabolites in *E. rutaecarpa* group

图可以划分成 11 个相关网络模块，其中蓝色圆形代表相关靶点、粉色六边形代表该通路中其他代谢物、红色六边形代表代谢通路中本研究获得的差异代谢物，边表示 3 种元素之间的关系。利用软件中 Analyze network 插件对网络模块图进行拓扑分析，结果见表 4，对代谢网络模块图进行整体分析发现节点度值高于平均节点度的差异代谢物共有 4 个，分别是花生四烯酸 (arachidonic acid)、亚油酸 (linoleic acid)、烟酰胺 (nicotinamide) 和棕榈酸 (palmitic acid) [15]，上述 4 个差异代谢物分别是所构建的花生四烯酸代谢通路、亚油酸代谢通路、烟酸及烟酰胺代谢通路、饱和脂肪酸 β -氧化通路的代谢产物，并且这 4 个通路在代谢组学网络模块图中占比最大。

3.5 相关性分析与分层聚类分析

采用相关性分析与分层聚类分析方法对吴茱萸组和对照组小鼠的血清样本数据进行处理。对 2 组小鼠血清中的 13 个差异代谢物进行相关性分析，结

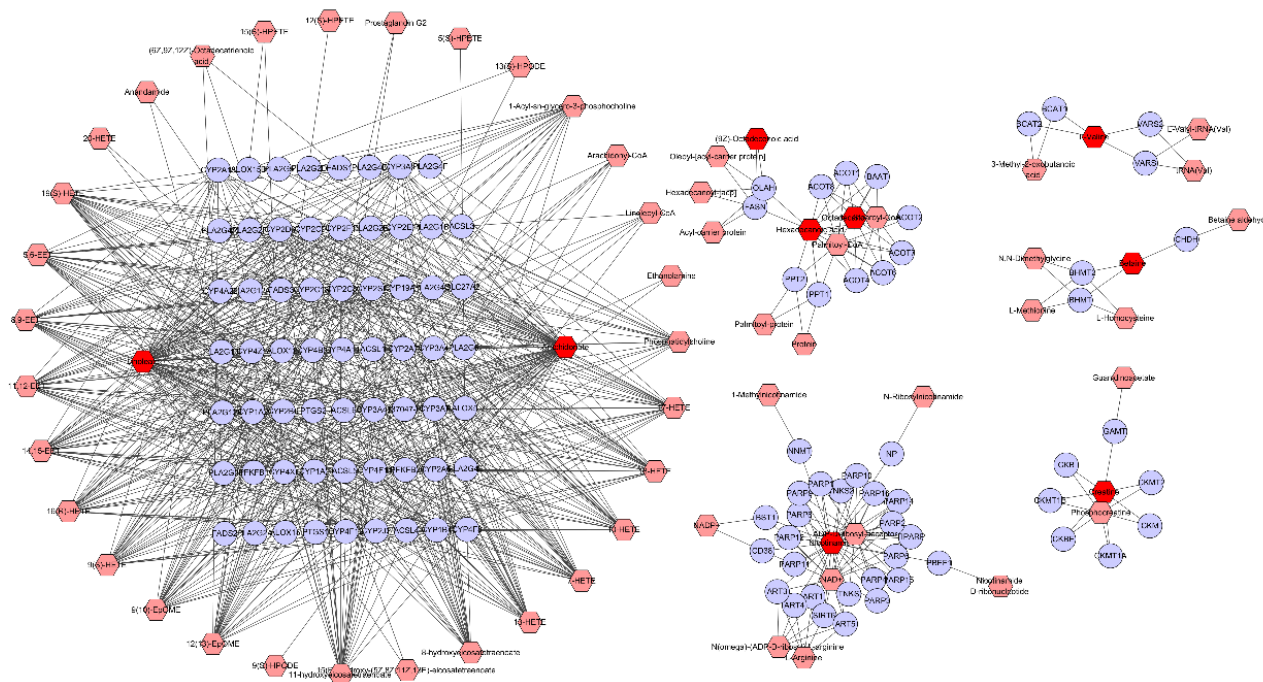


图 5 13 个差异代谢物代谢组学网络模块图

Fig. 5 Metabolomics network module diagram of 13 differential metabolites

表 4 13 个差异代谢物的代谢网络拓扑参数

Table 4 Topological parameters of metabolic network of 13 differential metabolites

参数	参数值	参数	参数值
聚类系数	0	平均邻居数	8.542
连通分量	6	节点数	177
网络直径	6	网络密度	0.049
网络半径	2	网络异构性	1.131
网络中心势	0.290	孤立节点	0
最短路径	10 742 (34%)	自循环数	0
特征路径长度	2.341	多边节点对	0

果如图 6 所示, 红色代表正相关性, 包括乙酰左旋肉碱(*L*-acetylcarnitine)、花生四烯酸、棕榈酸、油酸(oleic acid)、反油酸(elaidic acid)、肌酸(creatine)、二十碳六烯酸(docosahexaenoic acid)、亚油酸、硬脂酸(stearic acid)以及 β -羟基丁酸(β -hydroxybutyrate); 绿色代表负相关性, 包括 *L*-缬氨酸(*L*-valine)、甜菜碱(betaine)、烟酰胺(nicotinamide)。颜色越深, 表示相关性越强, 反之越弱。

分层聚类分析可得到 13 个差异代谢物的热图如图 7 所示, 图中颜色深浅表示这些差异代谢物在 2 组之间数值变化的大小。从图中可以看出, 吴茱

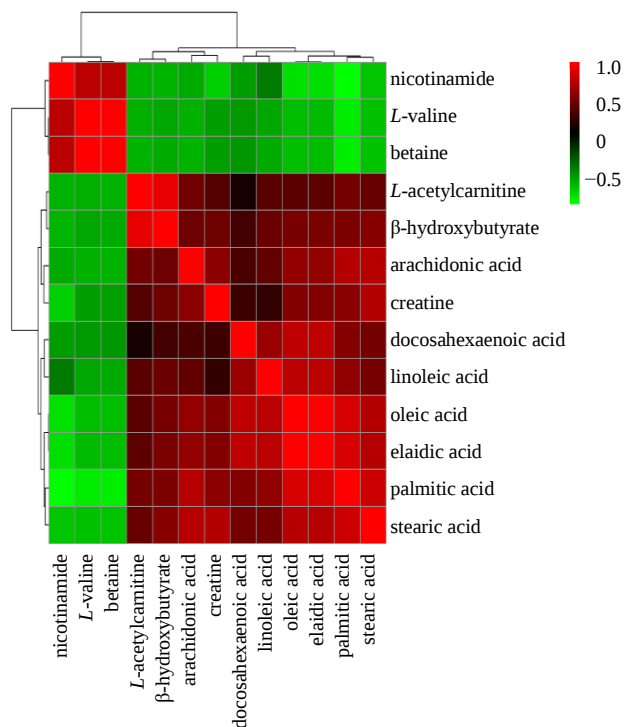


图 6 13 个差异代谢物相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis of 13 differential metabolites

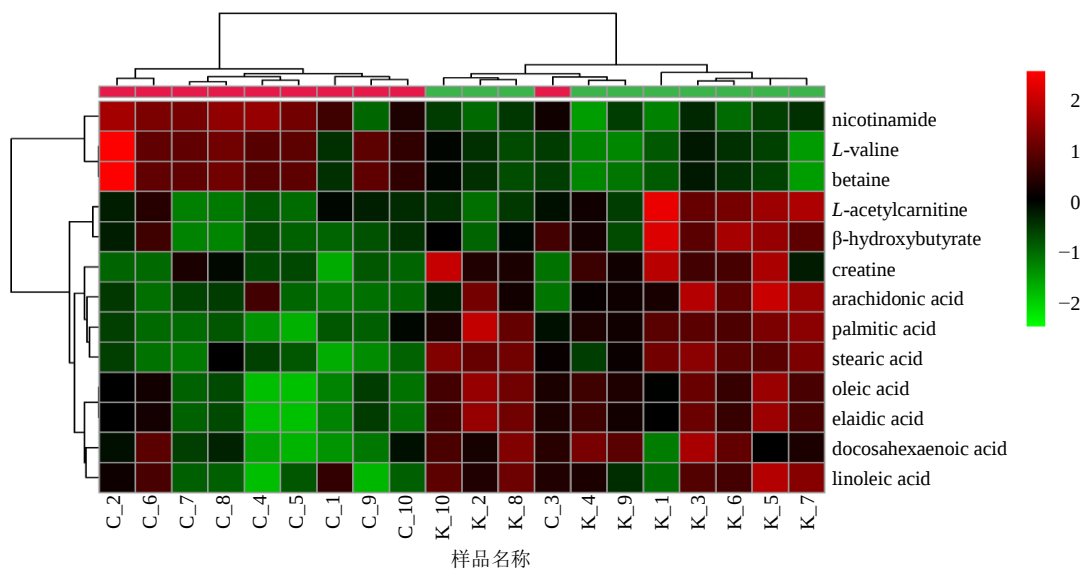


图 7 13 个差异代谢物分层聚类分析热图

Fig. 7 Heat map of hierarchical cluster analysis of 13 differential metabolites

萸组和对照组血清样本分离程度较好, 表明吴茱萸给能够对机体代谢物产生一定的影响。

3.6 靶点预测及分析

对上述代谢组学网络中的相关靶点进行预测, 共获得 80 个相关基因, 其中节点度高于平均值的基因共有 26 个, 如表 5 所示, 均为代谢网络模块图中 2 个最大模块的共有基因。利用度中心性、接近中心性和中介中心性算法对上述 26 个基因在代

谢网络中的重要程度进行评估, 发现 26 个基因度中心性值均为 18、接近中心性值均为 0.508 108 11、中介中心性值均为 0.008 825 65, 表明其在代谢网络中的重要性相同。进一步分析发现这 26 个基因同属细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 超家族, 表明吴茱萸可能通过作用于 CYP450 来改变小鼠体内代谢物, 进而发挥药效。本课题组前期对热性中药附子研究发现^[16], 其关键作用靶点也属

表 5 代谢组学网络中度值大于平均值的基因

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

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

于 CYP450, 提示热性中药发挥药效的作用机制可能与 CYP450 关系密切。

4 讨论

吴茱萸中含有生物碱、挥发油、苦味素等多种化学成分, 其中生物碱是其主要的活性成分^[17]。吴茱萸为临床常用的辛热性中药, 现代药理学研究表明, 吴茱萸碱具有抗炎镇痛、强心、降压、抗肿瘤、保护脑缺血损伤等多种药理作用^[18-20]。炎症反应是当机体受到致炎因子感染或化学、物理损伤时迅速发生的直接性防御反应, 主要表现为红肿热痛或功能障碍等^[21]。吴茱萸碱能够通过抑制白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 等炎症因子的表达和释放, 从而发挥抗炎作用^[22]。

本研究基于代谢组学技术分析吴茱萸干预后小鼠血清中代谢物的变化, 采用 OPLS-DA、PLS-DA、PCA、聚类分析等方法识别小鼠血清样本数据变化模式。由 PCA 分析结果可知, 吴茱萸组和对照组血清样本均有一定的聚集成群的趋势; PLS-DA 和 OPLS-DA 结果显示, 在有监督的情况下, 吴茱萸组和对照组血清样本聚集趋势进一步增强, 达到完全分离状态, 表明吴茱萸组小鼠血清中代谢物水平发生显著变化。相关性分析和分层聚类分析结果显示, 与对照组比较, 吴茱萸组小鼠血清中代谢产物水平发生显著变化, 且 2 组之间分离程度较好, 验证了吴茱萸能够调节小鼠血清中代谢产物水平。经筛选共获得花生四烯酸、棕榈酸、亚油酸、硬脂酸、二十二碳六烯酸等 13 个差异代谢物,

可作为吴茱萸干预后的生物标志物, 除 L-缬氨酸、甜菜碱、烟酰胺水平呈上升趋势外, 其余 8 个差异代谢物水平均为下降趋势。花生四烯酸、亚油酸、肌酸、棕榈酸等与机体蛋白质代谢、脂质代谢等能量过程密切相关^[23-25], 表明吴茱萸可能通过促进机体对花生四烯酸、亚油酸、肌酸等代谢产物的吸收和利用, 影响机体能量代谢状态, 发挥其辛热中药的药效作用, 与课题组前期对热性中药生物效应研究的结果一致^[26]。

本研究发现, 亚油酸、花生四烯酸、烟酸及烟酰胺代谢通路是吴茱萸作用于机体的主要代谢通路。亚油酸能够刺激 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 等多种炎症因子的表达, 加速炎症反应^[27]; 花生四烯酸作为一种具有重要生物功能的多不饱和脂肪酸, 能够促进促炎介质的合成, 放大炎症反应^[28]; 烟酰胺能够通过调节机体能量代谢, 阻断炎症细胞活化, 抑制 IL-8、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的释放^[29-30]。吴茱萸能够上调烟酸和烟酰胺代谢通路, 抑制花生四烯酸和亚油酸代谢通路, 提示这可能是吴茱萸作为辛热性中药发挥抗炎、调节免疫的作用机制之一。

代谢通路靶点分析结果表明, CYP450 可能是吴茱萸在机体内发挥作用的关键靶点。CYP450 作为机体内重要的代谢酶, 能催化多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 生成不同的代谢产物^[31-32]。花生四烯酸与 CYP450 关系密切, 其在机体内的第三条代谢途径就是通过 CYP2C、CYP2J2 等的环氧化作用生成环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs) ^[33-34]。EETs 不仅能够维持心脏功能, 还能够抑制单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的释放, 发挥抗炎作用^[33]。因此, 本研究中筛选获得的 CYP2C、CYP2J2 可能是吴茱萸发挥抗炎作用的靶点, 但其确切的分子机制有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S] 一部. 2015: 171.
- [2] 高振雷. 吴茱萸化学成分及药理作用研究概况 [J]. 科学技术创新, 2020, 24(13): 53-54.
- [3] 尚志钧. 孙星衍等辑《神农本草经》题吴普述质疑 [J]. 基层中药杂志, 1993, 7(3): 1-2.
- [4] 刘丽, 张笑敏, 许浚, 等. 吴茱萸化学成分和药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2689-2702.

- [5] 隋峰, 戴丽, 李倩, 等. TRPV1 通道介导的热生成是辛热(温)中药药性表征的重要模式 [J]. 药学学报, 2015, 50(7): 836-841.
- [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] 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.
- [10] Wishart D S, Tzur D, Knox C, *et al.* HMDB: The human metabolome database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: D521-D526.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 孟晶. 基于代谢组学的苦寒中药的分子机制研究. [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [14] 安卓玲, 史忱, 赵瑞, 等. 基于超高效液相色谱-质谱的药物性肝损伤患者血清代谢组学研究 [J]. 分析化学, 2015, 43(9): 1408-1414.
- [15] 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.
- [16] 马茜茜, 王春茜, 杨秀娟, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6269-6277.
- [17] Liu S S, Dai Y T, Sui F, *et al.* Flavonol glycosides from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(9): 867-874.
- [18] 文丽梅, 马超英, 余德林, 等. 吴茱萸的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 1976-1977.
- [19] 朱梅桂, 蒋建勤. 吴茱萸生物碱类化学成分及其药理活性研究近况 [J]. 云南化工, 2020, 47(8): 31-33.
- [20] 陈红林, 刘晗, 叶心怡, 等. 中药活性成分改善缺血缺氧所致脑微血管内皮屏障功能损伤的研究进展 [J]. 药学进展, 2015, 39(6): 415-424.
- [21] 柳泽深, 姜悦, 陈峰. 花生四烯酸、二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸在炎症中的作用概述 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(10): 3890-3899.
- [22] Yuan S M, Gao K, Wang D M, *et al.* Evodiamine improves cognitive abilities in SAMP8 and APP(swe)/PS1(Δ E9) transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 295-302.
- [23] 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.
- [24] Shi X J, Cheng Q Q, Xu L Y, *et al.* Cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase inhibit gluconeogenesis by targeting hepatocyte nuclear factor 4a [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(3): 485-497.
- [25] 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.
- [26] 王朋倩, 吴茵, 戴丽, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4352-4363.
- [27] Rong Y, He Y, Cheng L, *et al.* Protection mechanism of the main active ingredients combination of Yangyin Tongnao granules on cerebral is chemia/reperfusion injury rats [J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53(3): 199-204.
- [28] Lewis R A, Austen K F, Soberman R J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases [J]. *N Engl J Med*, 1990, 323(10): 645-655.
- [29] 杨驰, 郑咏秋, 戴敏. 烟酰胺药理作用研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(12): 1914-1916.
- [30] Traister A, Breitman I, Bar-Lev E, *et al.* Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2005, 40(10): 1226-1234.
- [31] Yi X, Lin J, Wang C, *et al.* CYP genetic variants, CYP metabolite levels, and neurologic deterioration in acute ischemic stroke in Chinese population [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(5): 969-978.
- [32] Huang H, Al-Shabraway M, Wang M H. Cyclooxygenase-and cytochrome P450-derived eicosanoids in stroke [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2016, 122: 45-53.
- [33] 焉晓乘, 牟维娜, 强晔, 等. CYP450 表氧化酶/EET 代谢途径通过 HIF-1 α 减轻肥胖小鼠脂肪炎症 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1661-1666.
- [34] Drolet B, Pilote S, Gélinas 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.

[责任编辑 李亚楠]