

基于拟靶向胆汁酸代谢组学筛选柴胡抗抑郁的活性部位

高芳荣^{1,2}, 王威宇^{1,2}, 罗培琰³, 李静^{1,2}, 秦雪梅^{1,2}, 高晓霞^{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 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 研究柴胡 *Bupleuri Radix* 不同极性部位对慢性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型大鼠抑郁样行为干预作用和神经递质调节作用, 筛选出最佳药效部位, 并建立一种能够测定抑郁大鼠胆汁酸谱的方法。方法 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、盐酸文拉法辛 (35 mg/kg) 组、柴胡低极性部位 (15 g/kg) 组、柴胡中极性部位 (15 g/kg) 和柴胡高极性部位 (15 g/kg) 组, 每组 9 只, 造模 28 d 同时给药, 动态测定大鼠的体质量变化, 通过糖水偏好实验和旷场实验检测行为学变化; 采用 UPLC-MS 测定血清中色氨酸 (tryptophane, Trp)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE)、多巴胺 (dopamine, DA)、乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸 (glutamic acid, Glu)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 含量; 采用全自动生化分析仪测定 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性和血清总胆红素 (serum bilirubin, TBIL) 含量; 采用 ELISA 测定盲肠内容物中总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平; 采用 UPLC-MS/MS 拟靶向代谢组学建立 36 种胆汁酸的拟靶向相对定量方法, 测定盲肠内容物胆汁酸谱, 并对组间胆汁酸差异性进行分析。**结果** 柴胡不同极性部位组和盐酸文拉法辛组均可回调 CUMS 引起的大鼠体质量、糖水偏爱率、直立次数、水平穿越格数异常和血清中 Trp、5-HT、5-HIAA、NE、DA、Ach、GABA、Glu、Tyr 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且柴胡低极性部位回调效果最好。同时柴胡低极性部位可显著回调大鼠血清 γ -GT 活性及血清 TBIL、盲肠内容物 TBA 含量 ($P < 0.05$ 、0.01); 建立了 36 种胆汁酸的拟靶向相对定量方法, 所建立的方法具有良好的稳定性, 胆汁酸谱分析表明, 柴胡低极性部位可调节盲肠内容物胆汁酸谱, 通过回调其中 5 种差异胆汁酸 (牛磺熊去氧胆酸、熊去氧胆酸、牛磺去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺石胆酸) 发挥药效作用。**结论** 柴胡低极性部位为抗抑郁最佳药效部位, 同时能够调节胆汁酸谱的代谢紊乱, 发挥肝保护作用。

关键词: 柴胡; 抑郁; 神经递质; 胆汁酸; 拟靶向代谢组学; 低极性部位; 柴胡多炔; 色氨酸; 5-羟色胺; 5-羟基吲哚乙酸; 去甲肾上腺素; 多巴胺; 乙酰胆碱; γ -氨基丁酸; 谷氨酸; 酪氨酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0832-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.014

Screening of anti-depressant active fractions of *Bupleuri Radix* based on pseudotargeted bile acid metabolomics

GAO Fangrong^{1,2}, WANG Weiyu^{1,2}, LUO Peiyan³, LI Jing^{1,2}, QIN Xuemei^{1,2}, GAO Xiaoxia^{1,2}

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

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To study the intervention effect of different polar parts of Chaihu (*Bupleuri Radix*) on depression-like behavior and neurotransmitter regulation in chronic unpredictable animal stress model (CUMS) rats, screen out the best effective parts, and

收稿日期: 2023-09-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174099); 山西省基础研究项目面上项目 (20210302123432); 名优普药再开发山西省重点实验室 (202104010910001); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004)

作者简介: 高芳荣 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药代谢组学。Tel: 18844218819 E-mail: chco_100706@163.com

*通信作者: 高晓霞, 女, 博士生导师, 教授, 从事中药药理学、中医药代谢组学研究。Tel: (0351)7019297 E-mail: gaioxiaxia@sxu.edu.cn

establish a method to determine the bile acid spectrum of depressed rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, venlafaxine hydrochloride (35 mg/kg) group, *Bupleuri Radix* low polarity fraction (15 g/kg) group, medium polarity fraction (15 g/kg) group and high polarity fraction (15g/kg) group, with nine rats in each group. 28 d of modeling and administration simultaneously, the body weight changes of rats were dynamically measured, and the behavioral changes were detected by sucrose preference test and open field test. UPLC-MS was used to determine the contents of tryptophane (Trp), 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), noradrenaline (NE), dopamine (DA), acetylcholine (Ach), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu) and tyrosine (Tyr) in serum. The activities of γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), alkaline phosphatase (ALP) and serum total bilirubin (TBIL) were measured by automatic biochemical analyzer. The level of total bile acid (TBA) in cecal contents was determined by ELISA. UPLC-MS/MS quasi-targeted metabolomics was used to establish a quasi-targeted relative quantitative method for 36 bile acids, and the bile acid spectrum of cecal contents was determined, and the differences of bile acids between groups were analyzed. **Results** The body weight, sugar water preference rate, rearing times, horizontal crossing grid abnormalities and serum levels of Trp, 5-HT, 5-HIAA, NE, DA, Ach, GABA, Glu and Tyr caused by CUMS could be callbaced by different polar parts of *Bupleuri Radix* and venlafaxine hydrochloride group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the callback effect of low polar parts of *Bupleuri Radix* was the best. At the same time, the low-polarity fraction of *Bupleuri Radix* can significantly restore the serum γ -GT activity and serum TBIL, cecal content TBA content ($P < 0.05, 0.01$); A quasi-targeted relative quantitative method for 36 bile acids was established, and the established method had good stability. The bile acid spectrum analysis showed that the low-polar part of *Bupleuri Radix* could adjust the bile acid spectrum of cecal contents. *Bupleuri Radix* could play a pharmacodynamic role by restoring five kinds of differential bile acids (tauroursodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, tauroursodeoxycholic acid, taurochenodeoxycholic acid, taurocholic acid). **Conclusion** The low polarity fraction of *Bupleuri Radix* is the best pharmacodynamic site for antidepressant, and it can regulate the metabolic disorder of bile acid spectrum and play a role in liver protection.

Key words: *Bupleuri Radix*; depression; neurotransmitters; bile acid; pseudotargeted metabonomics; low polarity part; polyacetylenes in *Bupleuri Radix*; tryptophane; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxyindoleacetic acid; noradrenaline; dopamine; acetylcholine; γ -aminobutyric acid; glutamic acid; tyrosine

柴胡 *Bupleuri Radix* 为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根, 辛、苦、微寒, 主入肝胆, 疏达经气, 宣通内外, 发挥枢利脏腑气血、和解少阳的功效^[1-2]。临床研究表明以其为君药的复方如逍遥散、大柴胡汤等, 常用于治疗胆汁淤积的肝病和并发抑郁等疾病^[3-4], 文献报道中药名方柴胡疏肝散通过调节磷脂和胆汁酸代谢缓解慢性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 诱导的肝损伤, 从而发挥抗抑郁作用^[5-8]。课题组前期研究发现, 柴胡低极性部位有多炔类 RB2、RB4 等代表性活性成分^[9-10], 并对 CUMS 模型大鼠肝组织进行转录组学研究发现, 柴胡低极性部位的抗抑郁作用与胆汁酸代谢密切相关^[11], 抑郁症发病机制涉及多重因素, 但具体机制尚未完全阐明。而近年来研究发现, 抑郁症的发病与胆汁酸的平衡发生紊乱密切相关。研究表明抑郁症存在胆汁酸代谢障碍^[12-17]。

胆汁酸是胆汁中发现的一大类胆烷酸总称, 作为胆汁的主要组成成分, 常以钠或钾的胆盐形式存在^[18]。现代研究表明胆汁酸是治疗胆汁淤积性疾病的重要靶点, 胆汁酸稳态失衡可导致胆汁酸过度积

累, 引发肝脏炎症和损伤^[19-20]。大量研究发现贯穿脑-肝-肠代谢轴的胆汁酸转运和代谢出现紊乱很可能是肝性脑病重要的发病机制^[21-22]。胆汁酸及其受体在抑郁症的发病机制中获得广泛关注。但由于种类众多, 不易全面定量分析。拟靶向代谢组学技术是许国旺团队于 2012 年首次提出的概念^[23], 是一种定量离子选择算法, 用于对所有检测到的代谢物进行定量离子选择, 通过保留时间锁定质谱选择离子监测方式, 样品中的已知和未知代谢物都可以被测量, 该方法结合了非靶向和靶向代谢组学的优点, 且不需要所有标样来限定检测的代谢物。由于抑郁症的发生发展与机体的代谢状态密切相关, 因此将拟靶向代谢组学研究用于检测胆汁酸谱的全面变化可以更好地研究疾病的发展。

本研究采用柴胡不同极性部位对 CUMS 抑郁大鼠模型进行实验, 通过监测行为学指标和分析血清神经递质水平的变化, 以筛选出最佳药效部位。通过测定肝功能指标和总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 水平, 表明柴胡低极性部位可发挥肝保护作用, 同时调节总胆汁酸水平。采用 UPLC-MS/MS 拟靶向代谢组学建立测定胆汁酸的方法, 能够测定大

鼠盲肠内容物胆汁酸种类和相对含量,为临床探究胆汁酸谱的具体变化提供方法,同时对柴胡通过胆汁酸代谢抗抑郁的机制研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级成年雄性SD大鼠54只,体质量(180±20)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)2012-0001。动物饲养于清洁环境,温度(23±2)℃,相对湿度(45±10)%,自由进食饮水,12h光照/黑暗周期。动物实验均通过山西大学科学研究伦理审查委员会审查(批准号SXULL2019005)。

1.2 药材

柴胡饮片(批号1805215131)购自安国市吉腾达药材有限公司,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为伞形科植物柴胡*B. chinense* DC.的干燥根或根茎,符合《中国药典》2020年版规定,留样于山西大学中医药现代研究中心。

1.3 药品与试剂

盐酸文拉法辛胶囊(批号171203)购自成都康弘药业集团股份有限公司;内标3,4-二羟基苄胺·氢溴酸(3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide, DHBA,批号MKBS7646V)购自美国Sigma公司;95%乙醇、石油醚、醋酸乙酯均为分析纯,购自北京化工试剂公司;蔗糖、羧甲基纤维素钠、聚山梨酯-80购自北京化学工业集团有限责任公司;水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,质谱级甲酸购自美国Thermo Fisher Scientific公司;对照品胆酸(cholic acid, CA,质量分数≥97%,批号201-337-8)、去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA,批号201-478-5)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA,批号207-481-8)、猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA,批号203-358-6)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA,批号204-879-3)、牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA,批号204-695-4)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA,批号207-457-6)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA,批号205-653-7)均购自上海源叶生物科技有限公司,以上对照品质量分数均≥98%;18β-甘草次酸(18β-glycyrrhetic acid, 18β-GA,质量分数≥98%)购自四川永健医药有限公司;TBA ELISA试剂盒(批号20160910)购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器

1290 II型超高效液相色谱仪(美国Agilent公司);3200Q-TRAP型三重四极杆串联质谱仪(美国AB Sciex公司);UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS超高效液相色谱质谱联用仪及Xcalibur工作站;Neofuge13R型高速冷冻离心机(力康公司);MX-S型可调式混匀仪(美国Scilogex公司);Milli-Q超纯水机(美国Millipore公司);Legend Micro17R型高速低温离心机;PRIME60i型全自动生化仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);旋转蒸发仪(德国艾卡公司);DHFSTPRP-24型高通量组织研磨仪(宁波洛尚智能科技有限公司);大鼠旷场实验测试箱(自制的无顶长方盒,长100cm、宽100cm、高70cm,盒中四壁及底面涂黑,底部白线划分成25个边长20cm的正方形格)。

2 方法

2.1 柴胡不同部位的提取

称取柴胡饮片适量,用8倍量95%乙醇浸泡12h,回流提取2次,每次2h,合并提取液,滤过,回收溶剂至干,加水分散,混悬液用等体积的石油醚萃取至无色,将上层萃取液回收溶剂至干即得柴胡石油醚低极性部位(出膏率1.6%);下层混悬液用等体积的醋酸乙酯萃取至无色,将上层萃取液回收溶剂至干,即得柴胡醋酸乙酯中极性部位(出膏率1.98%)。将药渣用8倍量的水回流提取2次,每次2h,合并提取液与醋酸乙酯萃取后的下层混悬液,回收溶剂,得到柴胡水提物高极性部位(出膏率17.8%)。

2.2 分组、造模及给药

54只SD大鼠适应性喂养7d后,根据体质量、糖水偏爱率、旷场实验的基线结果,随机分为对照组、模型组、盐酸文拉法辛(35mg/kg)组、柴胡低极性部位(15g/kg)组、柴胡中极性部位(15g/kg)和柴胡高极性部位(15g/kg)组,每组9只。使用课题组前期CUMS模型复制方法^[24],均采用单笼饲养,连续28d,大鼠每日给药后1h给予刺激,且每种刺激的实施随机不连续。刺激包括禁水,禁食24h,夹尾刺激2min,超声刺激3h,束缚3h,50℃热刺激5min,电击刺激(36V、10次),昼夜颠倒12h,4℃游泳5min。对照组大鼠正常饲养,每笼9只,且不给予任何刺激。造模同时各给药组ig相应药物(10mL/kg),对照组和模型组ig等体积溶剂(0.5%羧甲基纤维素钠-0.5%聚山梨酯80水溶液),1次/d,连续28d。

2.3 生物样本收集

给药结束后,通过股动脉取血的方式采集血液,置于EP管中,静置30 min后4 °C、3 500 r/min离心10 min,分离血清并分装;同时收集新鲜的盲肠内容物,放入液氮快速冷冻后储存于-80 °C冰箱中保存备用。

2.4 抑郁症大鼠行为学评价

参照文献报道方法^[25],通过大鼠的体质量变化、糖水偏好实验、旷场实验(水平穿越格数和直立次数)的测定数据,观察大鼠28 d内行为学变化。

2.5 血清中9种神经递质含量的测定

采用课题组前期建立的LC-MS法^[26],同时测定血清中的色氨酸(tryptophane, Trp)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)、去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)、多巴胺(dopamine, DA)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、酪氨酸(tyrosine, Tyr)9种单胺类神经递质的含量。

2.6 生化指标的测定

采用全自动生化分析仪测定 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性和血清总胆红素(serum bilirubin, TBIL)含量。

2.7 盲肠内容物TBA水平的测定

按照ELISA试剂盒说明书测定各组大鼠TBA水平。

2.8 UPLC-MS测定盲肠内容物胆汁酸谱

2.8.1 对照品溶液的制备 分别称取8种胆汁酸(CA、DCA、CDCA、HDCA、UDCA、TUDCA、TCDCa、TCA)对照品适量,结合型的水溶性胆汁酸对照品用超纯水溶解,其他胆汁酸对照品以甲醇为溶剂溶解,均配成1.0 mmol/L的对照品储备液,置于-80 °C的超低温冰箱中储藏备用,用于盲肠内容物胆汁酸检测的辅助鉴定。内标18 β -GA以甲醇为溶剂,配成1.0 mmol/L的对照品储备液备用。

2.8.2 样品制备 从-80 °C冰箱取出盲肠内容物样本,于4 °C下解冻,精密称定500 mg置于5 mL EP管,加入含内标的乙腈3 mL,涡旋2 min,4 °C、13 000 r/min离心15 min,取上清,取50 μ L进样分析。分别取样本10 μ L混合作为质控样本。取8种胆汁酸对照品均稀释1 μ mol/L,分别取50 μ L进样

分析。

2.8.3 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min, 2% B; 2~3 min, 2%~35% B; 3~17 min, 35%~70% B; 17~18 min, 70% B; 18~29 min, 70%~98% B; 29~31 min, 98% B; 31~33 min, 98%~2% B。体积流量0.3 mL/min;柱温45 °C;进样量5 μ L。

2.8.4 质谱条件 选择FullScan扫描模式,正、负离子切换同时扫描及Target扫描模式,使用Xcalibur 3.0软件对样品进行一级质谱数据采集,仪器参数为ESI源,喷雾电压+3.0 kV;喷雾电压-2.7 kV;毛细管温度320 °C;加热器温度300 °C;鞘气压力3 546.38 kPa;辅助气压力1 013.25 kPa;分辨率70 000;分辨率(dd-MS²)17 500,归一化碰撞能量为12.5、25.0、37.5 eV;扫描范围 m/z 50~1 200。

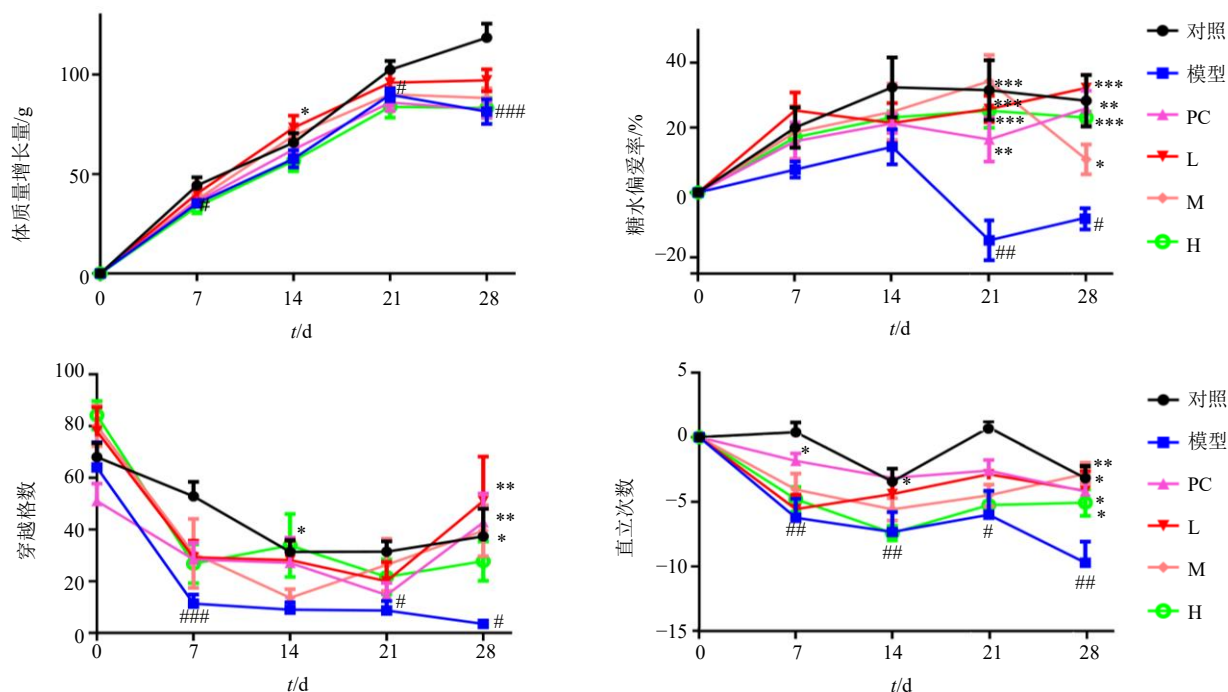
2.9 统计学分析

实验数据使用SPSS statistics 16.0、Graphpad Prism 7.0、Excel 2016等软件处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。针对两组数据间差异性比较采用SPSS 16.0软件进行 t 检验,作图软件为GraphPad Prism 7.0。

3 结果

3.1 柴胡抗抑郁最佳部位筛选

3.1.1 柴胡不同极性部位对CUMS大鼠行为学指标的影响 如图1所示,与对照组比较,模型组大鼠的基础生存状态下降,活跃程度及对四周环境的好奇心降低、快感缺失,提示抑郁模型复制成功。在实验开始时,各组大鼠体质量、糖水偏爱率、穿越格数、直立次数均无显著差异。造模21、28 d,与对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,造模28 d各给药组大鼠体质量均升高。造模21、28 d,与对照组比较,模型组大鼠糖水偏爱率显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各给药组大鼠糖水偏爱率显著升高($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。造模7、21、28 d,与对照组比较,模型组大鼠水平穿越格数显著降低($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,造模14 d柴胡高极性部位组大鼠水平穿越格数显著升高($P < 0.05$),造模28 d盐酸文拉法辛组、柴胡低极性部位组和柴胡中极性部位组大鼠水平穿越格数显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。造模7、14、21、28 d,与对照组比较,模型组大鼠直立次数显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);与



PC-盐酸文拉法辛; L-柴胡低极性部位; M-柴胡中极性部位; H-柴胡高极性部位; 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

PC-venlafaxine hydrochloride; L-Bupleuri Radix low polarity part; M-Bupleuri Radix medium polarity part; H-Bupleuri Radix high polarity part; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图1 柴胡不同极性部位对 CUMS 大鼠体重、糖水偏爱率、穿越格数和直立次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Effects of different polar parts of *Bupleuri Radix* on body weight, sucrose preference rate, number of crossing grids and rearing times in CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

模型组比较,造模 28 d 各给药组大鼠直立次数均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

以上结果表明柴胡不同极性部位可提高 CUMS 模型大鼠的活动能力以及对新奇事物的探索能力,体质量和糖水偏爱率显著回调,但其中柴胡低极性部位效果最好。

3.1.2 柴胡不同极性部位对 CUMS 大鼠血清中神经递质含量的影响 如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 Trp、5-HT、GABA、Tyr 的含量明显下降 ($P < 0.05, 0.01$), 5-HIAA、Glu、ACH、DA、NE 的含量也有所下降,但差异无统计学意义。与模型组比较,经不同极性部位给药处理后,柴胡中极性部位组的 Trp、GABA、Glu、ACH、Tyr、NE 水平明显升高 ($P < 0.01, 0.001$), DA 水平升高但无统计学差异;柴胡高极性部位组的 Trp、5-HT、5-HIAA、GABA、ACH、Tyr、DA 和 NE 水平明显升高 ($P < 0.01, 0.001$);盐酸文拉法辛组 Trp、GABA、Tyr 和 NE 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 5-HT 水平升高,但差异无统计学意义;柴胡低极性部位组的 Trp、5-HT、GABA、Tyr、和 NE 的水平明显升

高 ($P < 0.01, 0.001$), DA 水平升高,且与对照组相比更接近。

不同极性组分的联合应用可能会对多个靶点的作用起到一定的表征作用,而柴胡低极性部位可能具有最佳的抗抑郁效果。因此,被用于进一步研究。

3.2 柴胡低极性部位改善抑郁大鼠肝功能指标

如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 γ -GT 活性显著升高 ($P < 0.05$), TBIL 含量呈升高趋势,提示模型大鼠的肝功能异常,存在轻微的肝损伤。给予柴胡低极性部位后,大鼠血清中 γ -GT 活性和 TBIL 含量均显著降低 ($P < 0.05$), ALP 活性有回调趋势,表明柴胡低极性部位可改善抑郁大鼠肝功能。

3.3 柴胡低极性部位对 CUMS 大鼠盲肠内容物 TBA 水平的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠盲肠中 TBA 水平显著降低 ($P < 0.01$),提示抑郁模型胆汁酸代谢存在障碍。给予柴胡低极性部位后,大鼠盲肠中 TBA 含量显著回调 ($P < 0.01$),表明柴胡低极性部位可以缓解抑郁模型导致的 TBA 水平紊乱,

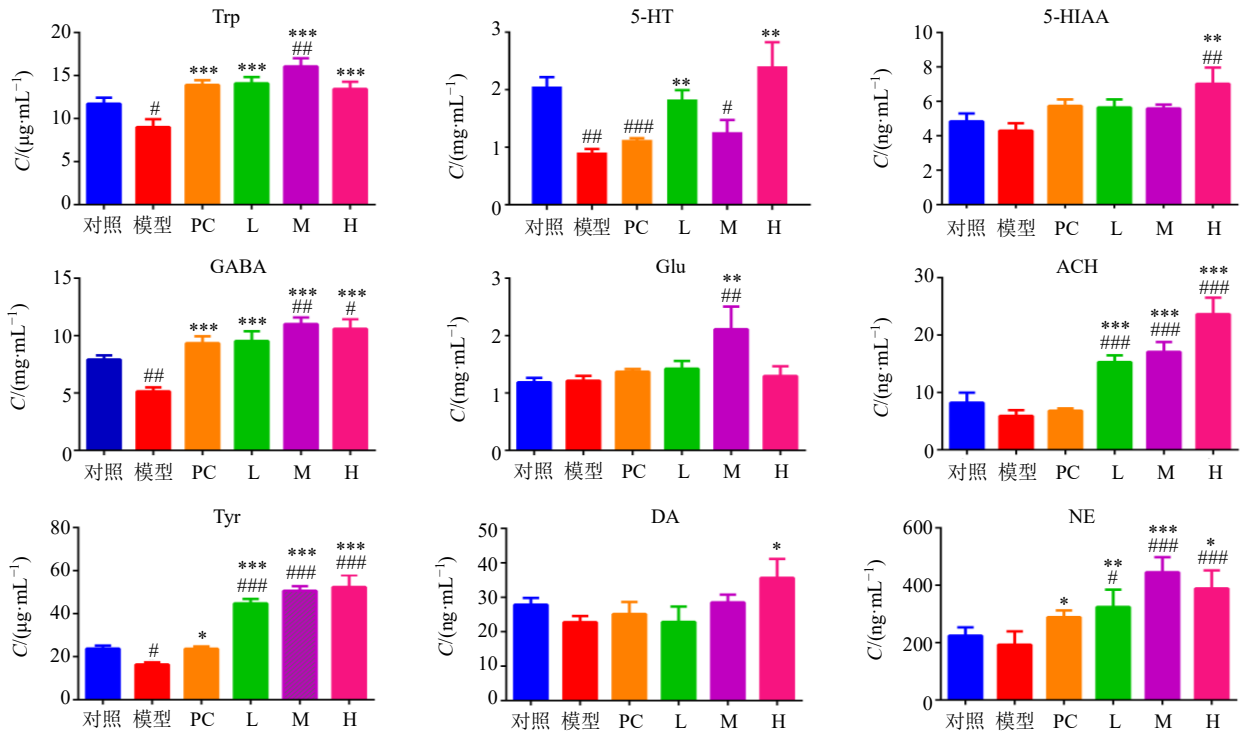


图2 柴胡不同极性部位对 CUMS 大鼠血清中神经递质含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effects of different polar parts of *Bupleuri Radix* on contents of neurotransmitters in serum of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

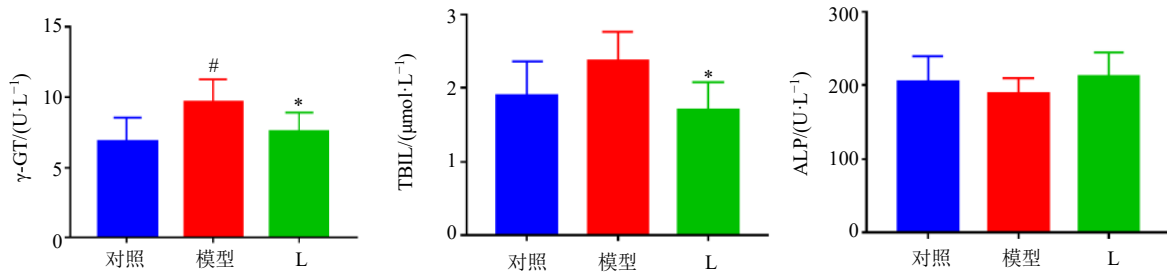


图3 柴胡低极性部位对 CUMS 大鼠血清中 γ -GT、ALP 活性和 TBIL 的含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of low polarity part of *Bupleuri Radix* on activities of γ -GT, ALP and content of TBIL in serum of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

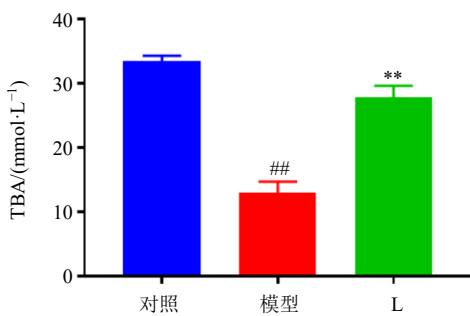


图4 柴胡低极性部位对 CUMS 大鼠盲肠内容物 TBA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

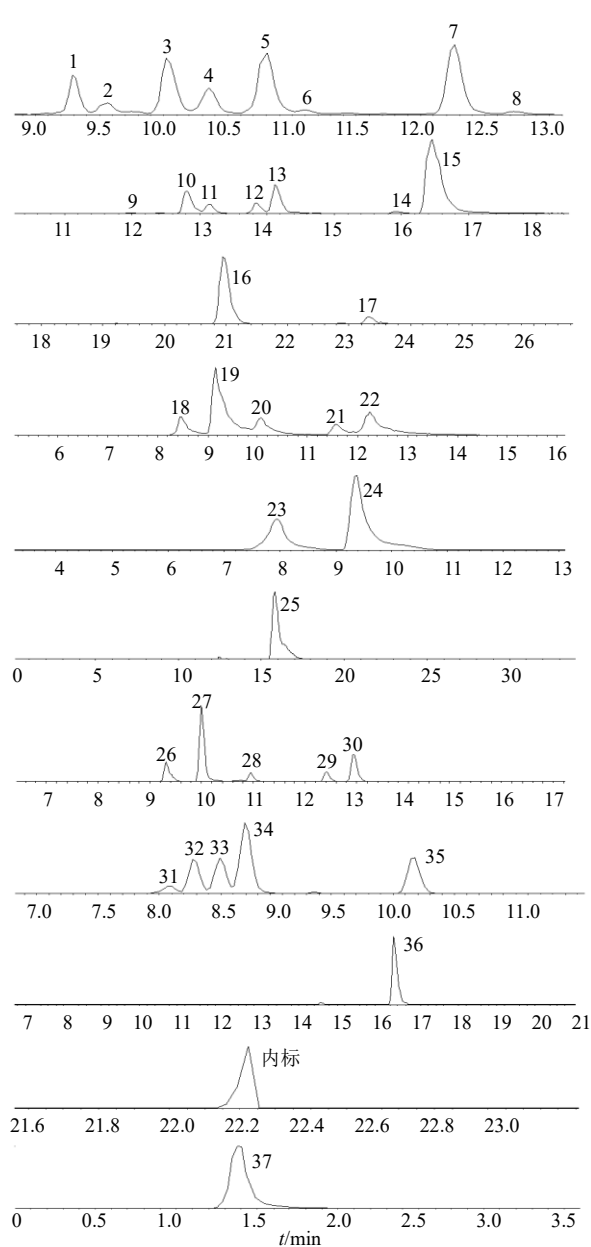
Fig. 4 Effect of low polarity part of *Bupleuri Radix* on TBA level in CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

其发挥抗抑郁作用可能与调节胆汁酸的代谢有关。

3.4 胆汁酸谱测定方法建立

3.4.1 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 仪器系统稳定性监测结果 每个质控样本分别提取的 36 个提取离子的 t_R 的 RSD 均在 0.5% 以下, m/z 的 RSD 在 4.02×10^{-7} 以内, 相对峰面积的 RSD 均小于 16%, 表明仪器稳定性较好, 建立的 UPLC-MS 测定的代谢组数据稳定可靠, 满足后续代谢组分析的要求。

3.4.2 质谱色谱专属性试验 在本实验条件下, 所有胆汁酸有较大的质谱峰和较好的分离度, 经处理的盲肠内容物中其他杂质不干扰样品的分离测定。图 5 为不同通道下 36 种胆汁酸加内标液色谱图。



1- ω -鼠胆酸; 2-CA-1; 3- α -鼠胆酸; 4- β -鼠胆酸; 5- γ -鼠胆酸; 6-CA-2; 7-CA; 8-CA-3; 9-D-1; 10-UDCA; 11-HDCA; 12-D-2; 13-D-3; 14-CDCA; 15-DCA; 16-石胆酸; 17-L-1; 18-TD-1; 19-TUDCA; 20-牛磺猪去氧胆酸; 21-TCDCa; 22-牛磺去氧胆酸; 23-牛磺- β -鼠胆酸; 24-TCA; 25-牛磺石胆酸; 26-GD-1; 27-甘氨酸去氧胆酸; 28-甘氨酸猪去氧胆酸; 29-甘氨酸鹅去氧胆酸; 30-甘氨酸去氧胆酸; 31-G-1; 32-G-2; 33-G-3; 34-G-4; 35-甘氨酸胆酸; 36-18 β -甘草次酸; 37-牛磺酸。

1- ω -MCA; 2-CA-1; 3- α -MCA; 4- β -MCA; 5- γ -MCA; 6-CA-2; 7-CA; 8-CA-3; 9-D-1; 10-UDCA; 11-HDCA; 12-D-2; 13-D-3; 14-CDCA; 15-DCA; 16-LCA; 17-L-1; 18-TD-1; 19-TUDCA; 20-THDCA; 21-TCDCa; 22-TDCA; 23-T- β -MCA; 24-TCA; 25-TLCA; 26-GD-1; 27-GUDCA; 28-GHDCA; 29-GCDCA; 30-GDCA; 31-G-1; 32-G-2; 33-G-3; 34-G-4; 35-GCA; 36-18 β -GA; 37-TAU。

图5 大鼠盲肠内容物36种胆汁酸及内标提取离子流图
Fig. 5 Extracted ion chromatogram of 36 bile acids and internal standard in cecal contents of rats

初级的胆汁酸类多为鼠胆酸和异构胆酸编号 CA-1~CA-3, 脱氧胆酸类未知的为 D-1~D-3, 石胆酸类未知的编号为 L-1, 牛磺脱氧胆酸类标号为 TD-1, 甘氨酸脱氧胆酸类 GD-1, 甘氨酸类 G-1~G-4, 共包括 8 个离子通道的 17 种非结合型胆汁酸和 19 种结合型胆汁酸。

3.5 盲肠内容物中差异胆汁酸分析

采用拟靶向代谢组的方法对对照组、模型组和柴胡低极性部位组大鼠盲肠内容物中的胆汁酸进行研究, 如图 6 所示, 共检测到 36 种胆汁酸, 总体趋势与 TCA 结果一致。模型组胆酸类 α -MCA、 ω -MCA、CA-2、CA、CA-3 含量均显著下降 ($P < 0.05$), 给药后 CA 含量显著回调, α -MCA、CA-3 呈回调趋势; 模型组脱氧胆酸类 UDCA、D-3、CDCA 的含量显著下降, 给药后 UDCA 显著上调, 其他有上调趋势; 模型组牛磺结合型胆汁酸均显著下降, 给药后 TLCA、TUDCA、TCDCa、TDCA 的含量显著回调; 模型组 GLCA、GCA 等甘氨酸类胆酸都有下降趋势, 给药后显回调趋势, 但无显著性差异。

将鉴定出来的 36 种胆汁酸类型按照分组进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 见图 7-A, 结果显示不同组之间有明显的聚类和分离趋势。随后将测定出来的 36 种胆汁酸按照模型组和给药组进行正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 见图 7-B, 可见两者具有一定分离趋势, 进一步设置变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) ≥ 1 和 t 检验 ($P < 0.05$) 进行差异代谢物的筛选, 筛选出 2 组的 5 种差异胆汁酸 (TUDCA、UDCA、TDCA、TCDCa、TLCA), 表明柴胡低极性部位主要通过回调这 5 种差异胆汁酸的含量来发挥抗抑郁作用。

4 讨论

神经递质假说是普遍公认的抑郁症发病机制, 认为抑郁症与神经突触间隙单胺类递质水平减少有关^[27]。研究表明, 体内神经突触间隙 NE、5-HT 或 DA 相对或绝对不足是引起抑郁症发生的重要原因, 且 5-HT 水平受其合成前体 Trp 和其代谢物 5-HIAA 含量的影响^[28], 模型组 Trp、5-HT 含量降低, 柴胡低极性部位组可回调 Trp、5-HT、5-HIAA 水平, 调控 5-HT 的代谢途径。研究发现应激性生活事件使 Glu 浓度升高, GABA 浓度降低, 引起 Glu 能系统过度激活, 而 GABA 神经传递活动减退, Glu 和

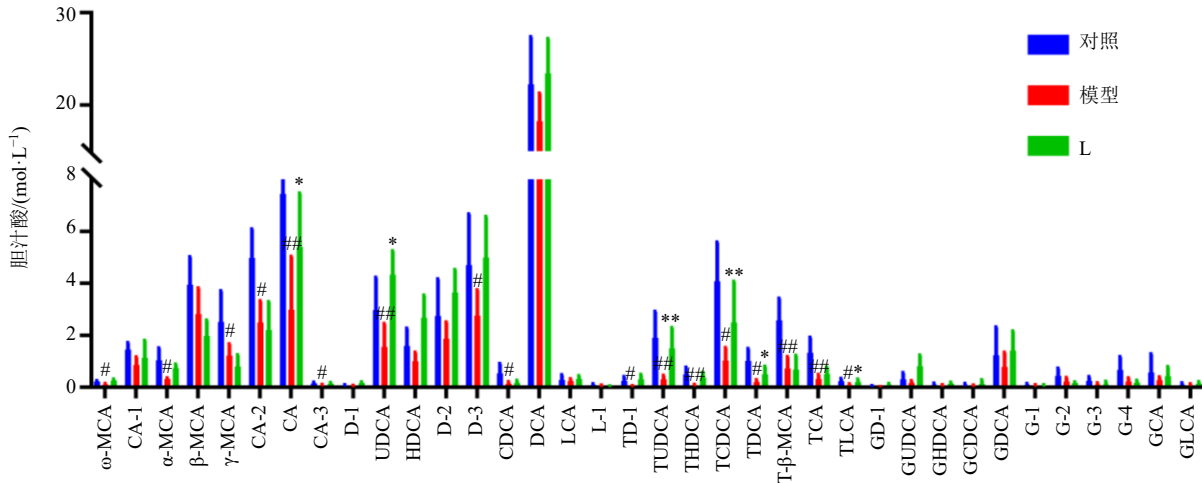


图6 大鼠盲肠内容物的胆汁酸谱结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 6 Results of bile acid spectrum of cecal contents in rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

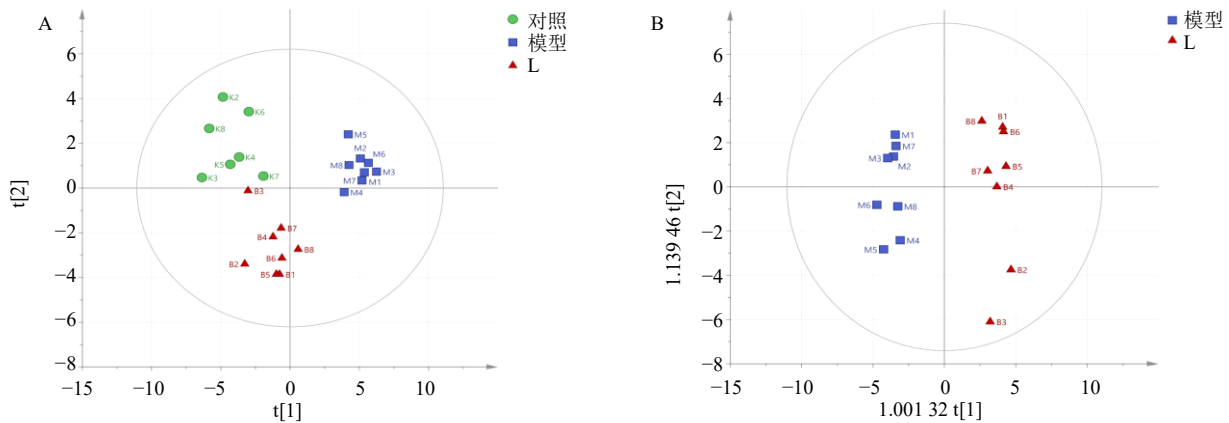


图7 各组胆汁酸类型 PCA 得分图 (A)、模型组和柴胡低极性部位组 OPLS-DA 得分图 (B)

Fig. 7 PCA score map of bile acid types in each group (A), OPLS-DA score map in model group and low polarity part of *Bupleuri Radix* group (B)

GABA 的平衡失调导致抑郁等情感障碍疾病的发生^[29]。模型组 GABA、GABA/Glu 含量降低, 给药后柴胡低极性部位组可显著升高 GABA 的水平, 调节氨基酸神经递质比例的平衡。

本研究中模型组血清 γ -GT 活性和 TBIL 含量均有不同程度的升高, 表明 CUMS 大鼠肝细胞可能存在一定程度的损伤, 与许多文献报道一致^[30-31]。而 ALP 的下调趋势与肝细胞损伤的结果相反, 临床上 ALP 活性下降见于贫血或者营养不良, 推测可能与抑郁大鼠饮食量降低造成的营养不良有关。而临床研究报道, 肝功能指标 γ -GT、TBIL、ALP 均可在疾病的不同严重程度检测到升高, 但是 ALP 的升高呈不规则性, 个体差异较大^[27], 这也可能是本研究 ALP 活性下降的另一个原因。给予柴胡低极性部位干预后, 生化指标均有不同程度的回调, 说明柴

胡低极性部位具有肝保护作用。

通过对盲肠内容物的 TBA 水平进行检测, 发现 TBA 发生了显著变化, 而 TBA 水平改变说明整个胆汁酸循环代谢出现障碍。给药后盲肠内容物总胆汁酸水平显著回调, 提示柴胡低极性部位可能促进胆汁排泄、调节胆汁酸代谢、合成等途径改善抑郁症。拟靶向代谢组学研究发现, 柴胡低极性部位给药后, 体内胆汁酸代谢发生了变化。文献研究表明, 重度抑郁障碍患者 TLCA 显著下降^[32], 这与本研究结果一致。研究发现, UDCA 可通过改变胆汁酸池, 抑制小肠吸收毒性胆汁酸等, 从而发挥肝保护作用^[33-34], 最近许多研究报道也发现 UDCA 具有神经保护作用^[35-36]。因此 UDCA 的下调可能是疾病发生的关键因素。已有研究表明 TUDCA 可以发挥抗抑郁样作用^[37]。柴胡疏肝散抗抑郁作用研究中发现

CUMS 大鼠肝组织中 TUDCA 水平显著下降, 与本实验结果一致^[38]。提示 UDCA 与 TUDCA 水平的降低可能与疾病的发生密切相关, 表明柴胡低极性部位可能通过调节胆汁酸谱从而治疗抑郁症, 具体代谢通路和机制仍需继续验证。此外, 课题组前期鉴定了柴胡低极性部位的入血成分, 具有代表性的 10 种活性成分为柴胡皂苷元 A、柴胡皂苷元 G、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、槲皮素、异鼠李素、多炔类 RB2、RB4、RB6、RB9^[9-10]。

综上, 本研究筛选出柴胡低极性部位为最佳抗抑郁部位, 具有较好的抗抑郁作用和保肝作用。同时具有调节胆汁酸谱的作用, 基于 UPLC-MS 建立了拟靶向代谢组学测定方法, 可同时测定 36 种胆汁酸的相对含量, 能够用于大鼠胆汁酸谱的测定。该方法前处理操作方便快捷, 灵敏度和特异性较高, 对某些疾病的早期无创诊断和深入的研究具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵香妍, 刘长利. 中药柴胡的研究概况与发展趋势 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 963-966.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293.
- [3] 朱平生, 王兵, 龙爱华. 不同经典方剂对肝外胆汁淤积大鼠肝肾功能的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(4): 319-321.
- [4] 林映仙, 杨文静, 曹宁宁, 等. 逍遥散及其加减方的抗抑郁作用比较研究 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 137-144.
- [5] Mao Q, Shi L, Wang Z G, *et al.* Chemical profiles and pharmacological activities of Chang-Kang-Fang, a multi-herb Chinese medicinal formula, for treating irritable bowel syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 201: 123-135.
- [6] Su Z H, Jia H M, Zhang H W, *et al.* Hippocampus and serum metabolomic studies to explore the regulation of Chaihu-Shu-Gan-San on metabolic network disturbances of rats exposed to chronic variable stress [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(3): 549-561.
- [7] Su Z H, Li S Q, Zou G A, *et al.* Urinary metabolomics study of anti-depressive effect of Chaihu-Shu-Gan-San on an experimental model of depression induced by chronic variable stress in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(3): 533-539.
- [8] Yu M, Jia H M, Zhou C, *et al.* Urinary and fecal metabolomics study of the protective effect of Chaihu-Shu-Gan-San on antibiotic-induced gut microbiota dysbiosis in rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46551.
- [9] 孟美黛. 柴胡抗抑郁活性部位与体内过程研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [10] 冯彦. 柴胡石油醚部位与 CUMS 模型大鼠肠道菌群的相互作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [11] 赵芳. 基于转录组学的柴胡石油醚部位抗抑郁作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [12] 陈秋涵, 方之勇. 中西医结合治疗肝肾亏虚型卒中后抑郁临床观察 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(9): 144-146.
- [13] 祖先鹏. 抑郁症患者代谢组与肠道菌群结构特征分析及 Bacopaside I 抗抑郁作用的机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.
- [14] 汪浏. 成年人群炎症标志物与抑郁症状的关联性研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [15] 梁梅丽. 基于 LC-MS 代谢组学技术的柴胡石油醚部位抗抑郁的量-效/毒关系研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [16] Hu W F, Wu J J, Ye T, *et al.* Farnesoid X receptor-mediated cytoplasmic translocation of CRTC2 disrupts CREB-BDNF signaling in hippocampal CA1 and leads to the development of depression-like behaviors in mice [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2020, 23(10): 673-686.
- [17] Gao Y, Mu J F, Xu T, *et al.* Metabolomic analysis of the hippocampus in a rat model of chronic mild unpredictable stress-induced depression based on a pathway crosstalk and network module approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 193: 113755.
- [18] Boyer J L, Soroka C J. Bile formation and secretion: An update [J]. *J Hepatol*, 2021, 75(1): 190-201.
- [19] Stofan M, Guo G L. Bile acids and FXR: Novel targets for liver diseases [J]. *Front Med*, 2020, 7: 544.
- [20] 韩欣. 刺五加酸调控 FXR 信号通路改善非酒精性脂肪肝的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2017.
- [21] Xie G X, Wang X N, Jiang R Q, *et al.* Dysregulated bile acid signaling contributes to the neurological impairment in murine models of acute and chronic liver failure [J]. *EBio Med*, 2018, 37: 294-306.
- [22] Xie G X, Wang X N, Huang F J, *et al.* Dysregulated hepatic bile acids collaboratively promote liver carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(8): 1764-1775.
- [23] Li Y, Ruan Q, Li Y L, *et al.* A novel approach to transforming a non-targeted metabolic profiling method to a pseudo-targeted method using the retention time locking gas chromatography/mass spectrometry-selected ions monitoring [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1255: 228-236.
- [24] 冯彦, 孟美黛, 冯建有, 等. 基于多维组学探究逍遥散低极性部位对 CUMS 模型大鼠的抗抑郁作用 [J]. 药学报, 2020, 55(2): 305-314.

- [25] 孟美黛, 冯彦, 王鹏, 等. 茯苓极性提取物对 CUMS 大鼠神经递质及昼夜节律调节的实验研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 118-126.
- [26] 赵芳, 李强, 梁梅丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大鼠血清中 8 种神经递质 [J]. 分析化学, 2018, 46(1): 121-128.
- [27] Chen C C, Yin Q C, Tian J S, *et al.* Studies on the potential link between antidepressant effect of Xiaoyao San and its pharmacological activity of hepatoprotection based on multi-platform metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112432.
- [28] Schienle A, Hetteema J M, Cáceda R, *et al.* Neurobiology and genetics of generalized anxiety disorder [J]. *Psychiatr Ann*, 2011, 41(2): 113-123.
- [29] Zhang Q X, Ma X L, Yang Y L, *et al.* Jieyuanshen Decoction exerts antidepressant effects on depressive rat model via regulating HPA axis and the level of amino acids neurotransmitter [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14(2): 33-46.
- [30] 李珍, 安书成, 李江娜. 抑郁症发生中 γ -氨基丁酸与其它相关递质的关系 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(3): 190-194.
- [31] 王国力. 慢性应激诱发抑郁大鼠肝实质损伤机制及疏肝中药的保护作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [32] Sinha S R, Haileselassie Y, Nguyen L P, *et al.* Dysbiosis-induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(4): 659-670.e5.
- [33] 张云静. 熊去氧胆酸对胆汁酸肠肝循环动力学的作用研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [34] 周剑寅. 熊胆粉及其主要成分熊去氧胆酸影响肝癌的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2013.
- [35] 王飞雪, 李浩, 周杰, 等. 通络化痰胶囊和熊去氧胆酸对 MPP⁺诱导的小鼠中脑神经细胞的保护作用研究 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(1): 1-6.
- [36] 徐晓琳. 牛黄有效成分抗脑梗死及调节内质网应激作用的比较研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [37] Lu X, Yang R R, Zhang J L, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable stress model of depression via attenuation of neuroinflammation, oxido-nitrosative stress, and endoplasmic reticulum stress [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2018, 32(4): 363-377.
- [38] Jia H M, Yu M, Ma L Y, *et al.* Chaihu-Shu-Gan-San regulates phospholipids and bile acid metabolism against hepatic injury induced by chronic unpredictable stress in rat [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life*, 2017, 1064: 14-21.

[责任编辑 李亚楠]