

· 药物代谢 ·

基于代谢组学技术分析四物汤治疗原发性痛经证的作用机制

何瑶, 王丽娟, 刘婷婷, 陈哲杰, 傅超美*, 刘盈
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:从内源性代谢物的角度研究四物汤治疗原发性痛经证的作用机制。方法:构建苯甲酸雌二醇-缩宫素联用致大鼠痛经模型;采用UPLC-Q-TOF-MS技术分析痛经大鼠血浆中代谢物的指纹图谱,电喷雾正离子模式(ESI^+)和负离子模式(ESI^-)对样品进行检测, m/z 50~1 000,结合质谱信息和公共数据库检索对检测到的代谢物进行鉴定;运用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)筛选正常组、痛经模型组和四物汤组之间的差异代谢物;对差异代谢物进行KEGG(京都基因与基因组百科全书)代谢通路分析。结果:痛经模型大鼠中检测鉴定23种内源性代谢产物;其中痛经模型组与正常组相比,黄体酮,11-脱氧皮甾醇,牛磺熊去氧胆酸和溶血磷脂酸为差异代谢物[变量重要性投影值(VIP)>1, $P<0.05$]。四物汤组与痛经模型组相比, L -苯丙氨酸, L -酪氨酸, N -苯甲酰甘氨酸, L -蛋氨酸,11-脱氧皮甾醇和硬脂酸甘氨酸酰胺为差异代谢物(VIP>1, $P<0.05$)。结论:四物汤对原发性痛经证大鼠体内差异代谢物有一定的回调作用,其作用机制主要与影响类固醇合成、溶血磷脂酸代谢、氨基酸代谢相关。

[关键词] 四物汤; 代谢组学; 原发性痛经; 主成分分析; 11-脱氧皮甾醇; 溶血磷脂酸; L -酪氨酸

[中图分类号] R969.1;R945;R271.1;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0082-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120082

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1406.012.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:06

Analysis of Therapeutic Mechanism of Siwutang in Primary Dysmenorrhea Syndrome Based on Metabolomics Technique

HE Yao, WANG Li-juan, LIU Ting-ting, CHEN Zhe-jie, FU Chao-mei*, LIU Ying
(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the mechanism of Siwutang in treating primary dysmenorrhea syndrome from the aspect of endogenous metabolites. **Method:** Dysmenorrhea rat model was constructed by injecting estradiol benzoate and oxytocin. UPLC-Q-TOF-MS was employed to analyze fingerprint of metabolites in plasma of dysmenorrhea rats under electrospray ionization positive and negative ion mode, the acquired metabolites were identified by mass spectrum informations and public database retrieval. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were adopted to screen the differential metabolites among the normal group, dysmenorrhea model group and Siwutang group; these different metabolites among three groups were analyzed by KEGG metabolic pathway method. **Result:** Twenty-three endogenous metabolites from dysmenorrhea model rats were detected and identified; when the dysmenorrhea model group compared with the normal group, progesterone, cortexolone, tauroursodeoxycholic acid and lysophosphatidic acid were the different

[收稿日期] 20170210(001)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81303238)

[第一作者] 何瑶,在读博士,讲师,从事中药制剂和新剂型研究,Tel:13882280308,E-mail:heyao3231@163.com

[通讯作者] *傅超美,教授,博士生导师,从事中药制剂和新剂型研究,Tel:028-61800231,E-mail:chaomeifu@126.com

metabolites with variable importance in the projection (VIP) > 1 and $P < 0.05$. When the Siwutang group compared with the model group, *L*-phenylalanine, *L*-tyrosine, *N*-benzoylglycine, *L*-methionine, cortexolone and stearic acid glycinamide were the different metabolites with VIP > 1 and $P < 0.05$. **Conclusion:** Siwutang has a certain callback effect on the differential metabolites in primary dysmenorrhea rats, its therapeutic mechanism is mainly related to steroid synthesis, lysophosphatidic acid metabolism and amino acid metabolism.

[**Key words**] Siwutang; metabolomics; primary dysmenorrhea; principal component analysis; cortexolone; lysophosphatidic acid; *L*-tyrosine

四物汤源于唐代蔺道人《仙授理伤续断秘方》，至宋代收载于《太平惠民和剂局方》，功效补血、活血、调经，主治冲任虚损、月水不调、脐腹亏痛、崩中漏下、血痕硬块、经行腹痛等，治妇人诸疾^[1]。方中以熟地黄滋阴补血，辅以当归补血养肝、和血调经，白芍和营养肝，川芎活血行滞。历代医家将四物汤作为治疗妇科疾患的专方和基础方，被誉为“妇科第一方”，用于治疗血虚血癖引起的诸多病症，并以其为基础加减化裁为诸多治疗妇人经行腹痛的方剂^[2]。中医认为，妇女正值经期或行经前后，会出现周期性小腹疼痛或痛引腰骶，甚则剧痛昏厥者，称为痛经，亦称经行腹痛；痛经的发病机制主要是由于气血运行不畅，或气血运行无力所致，通则不痛，痛则不通。以因经水为血所化，气为血之帅，血随气所行，气血充沛，气顺血和则经行畅通。现代医学认为，原发性痛经 (primary dysmenorrhea, PD) 是指非盆腔器质性病变引起的痛经，为内分泌功能失调所致；临床症见月经期下腹痉挛性疼痛，伴随头痛、恶心、呕吐、腹胀、腰酸、腿痛等；其发病机制主要与前列腺素、加压素、催产素、雌二醇、孕酮等有关^[3]。现有研究大多从临床和动物实验层面探得，四物汤对原发性痛经具有显著治疗效果，但其作用机制有待进一步揭示。

中药复方多成分、多靶点、多途径的特点，决定了中药复方的药效物质基础和药理作用机制研究的复杂性和艰巨性，构成了中医药研究与中药现代化进程中的关键问题。代谢组学具有融合整体、动态、综合、分析于一体的特点，国内外学者采用代谢组学方法对多种中药及复方的整体作用机制进行了研究^[4-5]。如有学者发现四物汤可回调血虚证模型大鼠糖类、脂类代谢紊乱以及免疫功能受损的生物标志物^[6]；香附四物汤对原发性痛经的治疗作用，涉及溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 代谢通路^[7]，甘油磷脂代谢、鞘脂代谢和类固醇激素生物合成^[8]，前列腺素和溶血磷脂^[9]。目前还未见有对四物汤治疗原发性痛经证的代谢组学研究。

课题组前期以四物汤为研究对象，从该复方补

血、活血、调经的功效出发，构建“组分-药效-靶点”作用网络，开展了四物汤化学成分及药效作用研究^[10-12]。本实验联用苯甲酸雌二醇-缩宫素建立原发性痛经证大鼠模型，采用代谢组学技术研究原发性痛经证的内源性生物标记物和四物汤对该病证的治疗作用，从体内代谢物角度阐明四物汤治疗原发性痛经证的作用机制。

1 材料

1290 型超高效液相色谱-6540 型四级杆飞行时间质谱联用仪 (美国 Agilent 公司)。熟地黄、当归、白芍和川芎饮片 (四川省新荷花中药饮片有限公司，产地依次为河南、甘肃、四川、四川，批号分别为 1308077, 1405044, 1404064, 1406054，经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定，均符合《中国药典》2015 年版的相关项下要求)，缩宫素注射液和苯甲酸雌二醇注射液 (赤峰博恩药业有限公司，规格分别为 $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ ，批号均为 120901)。

清洁级 SD 雌性大鼠，体重 250 ~ 270 g，由四川省医学科学院动物研究中心提供，合格证号 SCXK (川)2013-15，动物实验符合实验动物福利伦理审查指南的要求。

2 方法与结果

2.1 原发性痛经模型试验 取当归、川芎、白芍、熟地黄饮片各 12.5 g，加 7 倍量水浸泡 0.5 h，煎煮 1 h，第 2, 3 次各加 6 倍量水煎煮 1.5 h，合并 3 次煎煮液，减压浓缩并定容至 100 mL。30 只大鼠随机分为正常组、痛经模型组、四物汤组，每组 10 只。痛经模型组与四物汤组每天上午皮下注射苯甲酸雌二醇，连续 7 d，每天 1 次，首次与末次给药剂量 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，第 2 ~ 5 天给药剂量 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，正常组注射同体积生理盐水；四物汤组每天下午按剂量 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药四物汤，正常组与痛经模型组灌胃同体积生理盐水。第 7 天末次给药后 1 h，按剂量 $20 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射缩宫素，之后在 0 ~ 30 min 内取血，于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，得血浆 (肝素抗凝)， $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 度保存，备用。

2.2 LC-MS 分析

2.2.1 血浆样品预处理 取血样 100 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 200 μL ,充分混匀 1 min,于 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,待检。

2.2.2 检测条件 采用 Waters BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 60% B; 6 ~ 12 min, 60% ~ 98% B; 12 ~ 13 min, 98% B; 13 ~ 14 min, 98% ~ 2% B; 14 ~ 15 min, 2% B),流速设定 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。采用电喷雾正离子模式 (ESI⁺) 和负离子模式 (ESI⁻) 对样品进行检测,数据采集范围 m/z 50 ~ 1 000;毛细管电压 4 kV,喷针电压 1 kV,鞘气温度 250 $^{\circ}\text{C}$,雾化器压力 3.091 $\times 10^5$ Pa,干燥气流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,碎裂电压 140 V。

2.3 数据分析与代谢物鉴定 利用 LC-MS 预处理软件 XCMS 对检测获得的原始文件进行峰识别、峰

过滤、峰对齐等数据预处理,筛选出前 12 min 的数据并对数据进行峰面积的归一化处理。在 Simca-P 13.0 软件中,样品分型前对数据采用 Pareto 缩放,以获得更加可靠且更加直观的结果。通过主成分分析 (PCA) 进行无监督的数据分析,观察各组数据的聚类并去除离群样本;利用偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 进行有监督的数据分析,并采用置换检验防止 PLS-DA 模型的过度拟合;结合 S-plot, PLS-DA 模型变量的变量重要性投影值 (VIP) ($\text{VIP} > 1$) 及载荷图和 t 检验对差异变量进行筛选。

2.3.1 代谢物鉴定 根据精确相对分子质量进行初步确认 (设置相对分子质量误差 < 5 ppm),后续根据 MS/MS 碎片信息比对公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca>), Metlin (<http://metlin.scripps.edu>), MassBank (<http://www.massbank.jp/>), LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>) 进行进一步确认,对代谢物进行鉴定,见表 1。血浆样本 LC-MS 总离子流图见图 1。

表 1 四物汤治疗原发性痛经证的血浆代谢物分析

Table 1 Analysis of metabolites in plasma of primary dysmenorrhea rats treated by Siwutang

No.	t_{R} /min	m/z	δ /ppm	模式	分子式	代谢物	KEGG 代谢通路	相对丰度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
								正常组	痛经模型组	四物汤组
1	0.72	106.05	0	[M + H] ⁺	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	L-脯氨酸	C00148	0.080 \pm 0.008	0.090 \pm 0.012	0.067 \pm 0.007 ²⁾
2	0.77	150.06	4	[M + H] ⁺	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	L-蛋氨酸	C00073	0.926 \pm 0.193	0.940 \pm 0.236	0.596 \pm 0.236 ²⁾
3	1.14	182.08	1	[M + H] ⁺	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	L-酪氨酸	C00082	5.329 \pm 0.849	4.319 \pm 1.254	2.114 \pm 0.399 ²⁾
4	1.92	166.09	0	[M + H] ⁺	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	L-苯丙氨酸	C00079	10.130 \pm 0.753	9.833 \pm 2.009	6.655 \pm 1.258 ²⁾
5	2.24	232.15	0	[M + H] ⁺	$\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	丁酰基-L-肉碱	C02862	1.110 \pm 0.314	0.925 \pm 0.378	1.105 \pm 0.217
6	2.58	203.08	1	[M - H] ⁻	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	L-色氨酸	C00078	8.371 \pm 1.583	10.060 \pm 2.570	8.237 \pm 1.778
7	2.83	246.17	1	[M + H] ⁺	$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	2-甲基丁酰肉碱	NA	0.237 \pm 0.052	0.220 \pm 0.161	0.144 \pm 0.033
8	3.12	178.05	2	[M - H] ⁻	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	N-苯甲酰甘氨酸	C01586	2.480 \pm 0.914	1.523 \pm 1.121	2.636 \pm 0.754 ²⁾
9	4.26	187.10	2	[M - H] ⁻	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	壬二酸	C08261	0.163 \pm 0.048	0.139 \pm 0.048	0.133 \pm 0.03
10	4.77	190.09	2	[M + H] ⁺	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	3-吡啶丙酸	NA	0.261 \pm 0.135	0.152 \pm 0.101	0.242 \pm 0.146
11	4.99	347.22	2	[M + H] ⁺	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$	11-脱氧皮甾醇	C05488	0.146 \pm 0.052	0.285 \pm 0.064 ¹⁾	0.217 \pm 0.05 ²⁾
12	5.21	498.29	2	[M - H] ⁻	$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_6\text{S}$	牛磺熊去氧胆酸	C16868	0.656 \pm 0.339	0.180 \pm 0.154 ¹⁾	0.154 \pm 0.09
13	6.29	391.28	0	[M + H] ⁺	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯	NA	0.023 \pm 0.032	0.007 \pm 0.002	0.047 \pm 0.056
14	6.59	391.28	2	[M - H] ⁻	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$	脱氧胆酸	C04483	0.107 \pm 0.059	0.057 \pm 0.020 ¹⁾	0.110 \pm 0.079
15	7.41	313.24	4	[M - H] ⁻	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4$	9,10-DiHOME	C14828	0.185 \pm 0.084	0.182 \pm 0.139	0.133 \pm 0.093
16	7.45	380.26	1	[M + H] ⁺	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_5\text{P}$	鞘氨醇 1-磷酸	C06124	0.872 \pm 0.333	0.774 \pm 0.195	0.707 \pm 0.221
17	7.62	315.24	21	[M + H] ⁺	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$	黄体酮	C00410	0.038 \pm 0.032	0.173 \pm 0.041 ¹⁾	0.180 \pm 0.085
18	8.56	520.27	5	[M - H] ⁻	$\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{NO}_9\text{P}$	PS(18:2(9Z,12Z)/0:0)	NA	0.423 \pm 0.105	0.467 \pm 0.157	0.381 \pm 0.09
19	8.76	303.23	1	[M + H] ⁺	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	5(S)-HETE lactone	NA	0.609 \pm 0.609	0.571 \pm 0.293	0.367 \pm 0.168
20	8.81	334.25	28	[M + H] ⁺	$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_3$	硬脂酸甘氨酸酰胺	NA	0.089 \pm 0.038	0.103 \pm 0.032	0.060 \pm 0.022 ²⁾
21	9.02	319.23	3	[M - H] ⁻	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$	5-羟基二十碳四烯酸	NA	10.230 \pm 2.55	6.972 \pm 4.561	4.685 \pm 1.793
22	9.83	457.24	0	[M - H] ⁻	$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	溶血磷脂酸	NA	0.146 \pm 0.054	0.234 \pm 0.055 ¹⁾	0.185 \pm 0.039 ²⁾
23	10.20	550.39	1	[M + H] ⁺	$\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{NO}_7\text{P}$	1-O-(cis-9-octadecenyl)- 2-O-acetyl-sn-glycero-3-phos- phocholine	NA	2.165 \pm 1.368	1.459 \pm 0.757	1.347 \pm 0.590

注:NA 表示数据库中没有信息;与正常组比¹⁾ $P < 0.05$,与痛经模型组比²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

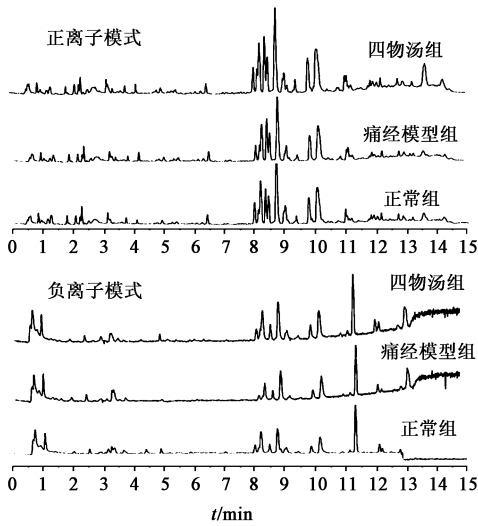
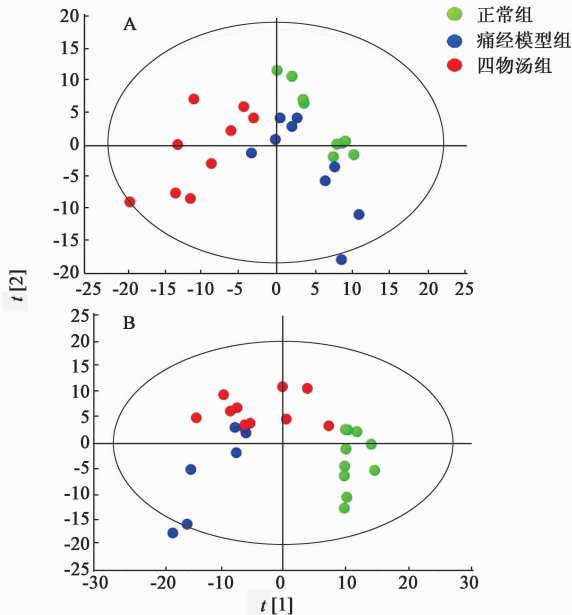


图 1 不同组别血浆样本的 LC-MS 总离子流
Fig. 1 TIC of plasma samples from different groups

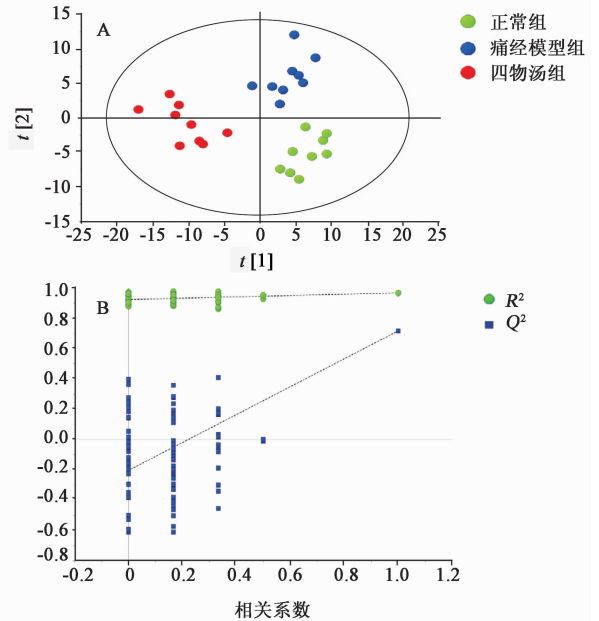
2.3.2 PCA 对所有样本进行主成分降维分析。自动模拟过程中,正离子模式下获得 4 个主成分, $R^2 X$ (模型可解释的变量) = 0.427, Q^2 (模型的可预测度) = 0.017; 负离子模式下获得 3 个主成分, $R^2 X$ = 0.442, Q^2 = 0.113。PCA 得分见图 2, 样本基本都处于 95% 置信区间内。正常组、痛经模型组、四物汤组可显著区分, 说明 3 组之间代谢信息发生了改变。



A. 正离子模式; B. 负离子模式
图 2 不同组别血浆代谢物的 PCA 得分
Fig. 2 PCA scores of plasma metabolites from different groups

2.3.3 PLS-DA PLS-DA 多元统计分析为有监督的分析模型, 相比 PCA 能更大程度地区分代谢物和组间的差异, 具有更清晰的趋势。得到的 $R^2 Y$ 表示 PLS-DA 模型建模过程中所能解释的变量数据的比

例, R^2 表示模型的拟合度, Q^2 表示模型的可预测度, 这些参数越接近 1, 表示该模型越可靠。得分见图 3, 4。正离子模式下 $R^2 Y = 0.976$, $Q^2 = 0.745$; 负离子模式下 $R^2 Y = 0.903$, $Q^2 = 0.776$ 。说明该模型的建模能力和预测能力均较好, 3 组可显著区分, 在 PLS-DA 模型基础之上进行置换检验, 进一步考察 PLS-DA 模型是否可靠。正离子模式 100 次验证



A. PLS-DA 得分; B. PLS-DA 置换检验 (图 4 同)
图 3 正离子模式下血浆代谢物 PLS-DA 分析
Fig. 3 PLS-DA analysis of plasma metabolites under positive ion mode

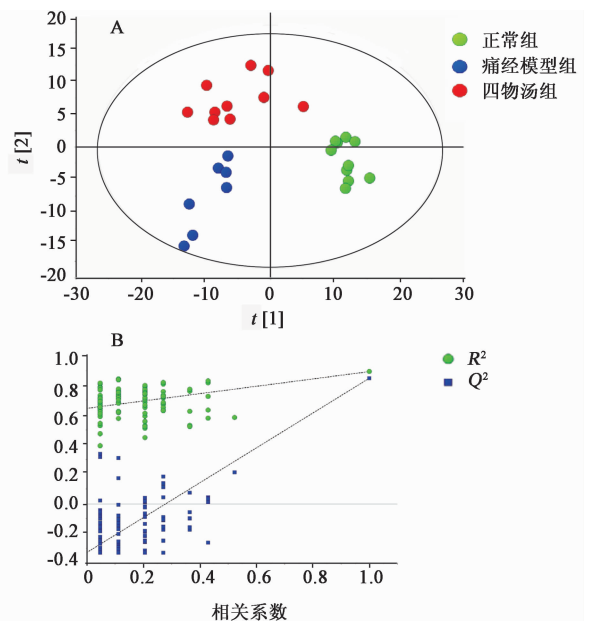
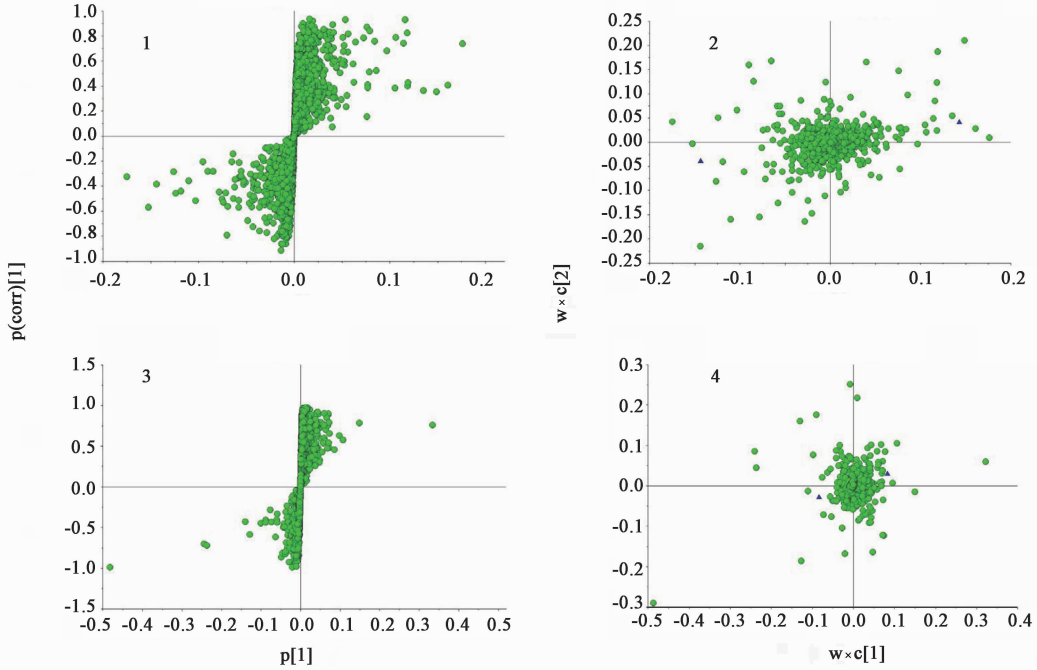


图 4 负离子模式下血浆代谢物 PLS-DA 分析
Fig. 4 PLS-DA analysis of plasma metabolites under negative ion mode

结果显示 R^2 在 Y 轴上的截距 0.922, Q^2 在 Y 轴上的截距 -0.205, 见图 3。计算负离子模式 100 次验证结果显示 R^2 在 Y 轴上的截距 0.644, Q^2 在 Y 轴上的截距 -0.33, 见图 4, 说明该模型可靠。

2.3.4 差异代谢物的筛选 采用 S-plot 选择差异变量; 利用 PLS-DA 模型第 1 主成分的 VIP (阈值 > 1) 并结合 t 检验的 P (阈值 0.05) 来寻找差异性表达

代谢物。在图 5, 6 中, S-plot (利用主成分 1 作图) 每个方块表示 1 个化合物, 代表了变量在主成分 1 上的重要性 (权重系数) 和与主成分 1 的相关系数, 代表了变量与模型的相关性, 越靠近左下角和右上角的化合物表示对各组分类的贡献越大。在载荷图中, 离原点越远的点表示对各组分类的贡献越大。S-plot 图中的结论在载荷图也可得到同样体现。



1, 2. 正离子模式; 3, 4. 负离子模式 (图 6 同)

图 5 正常组和痛经模型组的 S-plot (1, 3) 和 PLS-DA 载荷 (2, 4)

Fig. 5 S-plot (1, 3) and PLS-DA loading plot (2, 4) of normal group and dysmenorrhea model group

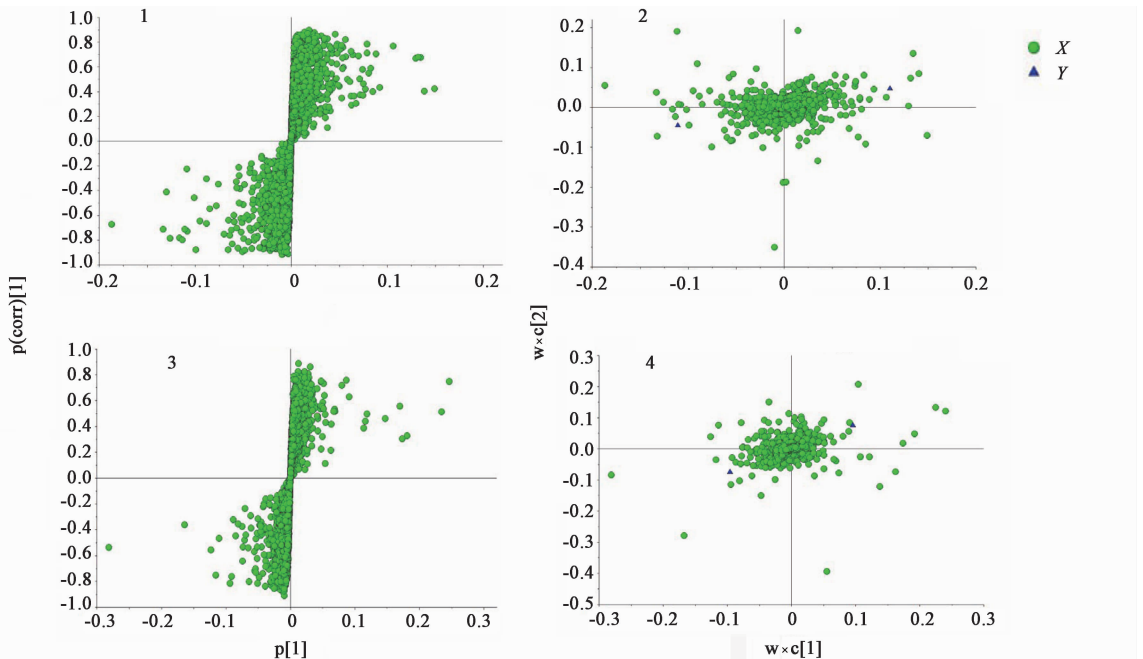


图 6 痛经模型组和四物汤组样本的 S-plot (1, 3) 和 PLS-DA 载荷 (2, 4)

Fig. 6 S-plot (1, 3) and PLS-DA loading plot (2, 4) of dysmenorrhea model group and Siwu Tang group

由差异代谢物筛选结果并结合表 1 中各代谢物的相对丰度可知,痛经模型组与正常组相比,筛选出贡献最大的内源性差异代谢物有 4 个(黄体酮、牛磺熊去氧胆酸、溶血磷脂酸和 11-脱氧皮甾醇)。给予四物汤后,对 11-脱氧皮甾醇、溶血磷脂酸有显著的回调作用,使之接近正常组;对于黄体酮、牛磺熊去氧胆酸的调节作用不明显。痛经模型组和四物汤组相比,筛选出贡献最大的内源性差异代谢物有 6 个,分别为 *L*-苯丙氨酸,*L*-酪氨酸,*N*-苯甲酰甘氨酸,*L*-蛋氨酸,11-脱氧皮甾醇和硬酯酸甘氨酸酰胺。四物汤给药后,显著降低痛经证大鼠体内 11-脱氧皮甾醇,硬酯酸甘氨酸酰胺,*L*-苯丙氨酸,*L*-酪氨酸和 *L*-蛋氨酸的含量,显著升高 *N*-苯甲酰甘氨酸含量。说明对于原发性痛经模型大鼠,给予四物汤后可部分恢复和改变内源性代谢产物的体内水平。见表 2。

表 2 差异代谢物的相对丰度变化趋势

Table 2 Trend of relative abundance of differential metabolites

差异代谢物	痛经模型组变化趋势 (与正常组比较)	四物汤组变化趋势 (与痛经模型组比较)
黄体酮	升高 ¹⁾	升高
11-脱氧皮甾醇	升高 ¹⁾	降低 ²⁾
牛磺熊去氧胆酸	降低 ¹⁾	降低
溶血磷脂酸	升高 ¹⁾	降低 ²⁾
<i>L</i> -苯丙氨酸	降低	降低 ²⁾
<i>L</i> -酪氨酸	降低	降低 ²⁾
<i>N</i> -苯甲酰甘氨酸	降低	升高 ²⁾
<i>L</i> -蛋氨酸	升高	降低 ²⁾
硬酯酸甘氨酸酰胺	升高	降低 ²⁾

2.3.5 KEGG 代谢通路活性分析 通过化合物名称进行 KEGG 注释,获得 KEGG compound 化学物标识码 ID,根据 ID 得到代谢物参与的 KEGG 代谢通路。差异代谢物中,*L*-苯丙氨酸,*L*-酪氨酸,*L*-蛋氨酸和 *N*-苯甲酰甘氨酸主要参与氨基酸代谢,黄体酮主要参与前列腺素代谢,牛磺熊去氧胆酸主要参与能量代谢、类固醇类激素合成,11-脱氧皮甾醇主要参与类固醇激素的合成,溶血磷脂酸主要参与磷脂酸代谢。提取 KEGG 化学物标识码 ID 和代谢物相对丰度,计算每条代谢通路的 PAPI(代谢通路影像值),以计算每条代谢通路的活性得分即每条代谢通路的活性程度来表示,对每条代谢通路进行富集分析,对富集的代谢通路进行倍性变化热图分析^[13],见图 7。图中绿色表示相对活跃,红色表示相对不活跃。例如四物汤对酪氨酸、苯丙氨酸、维生

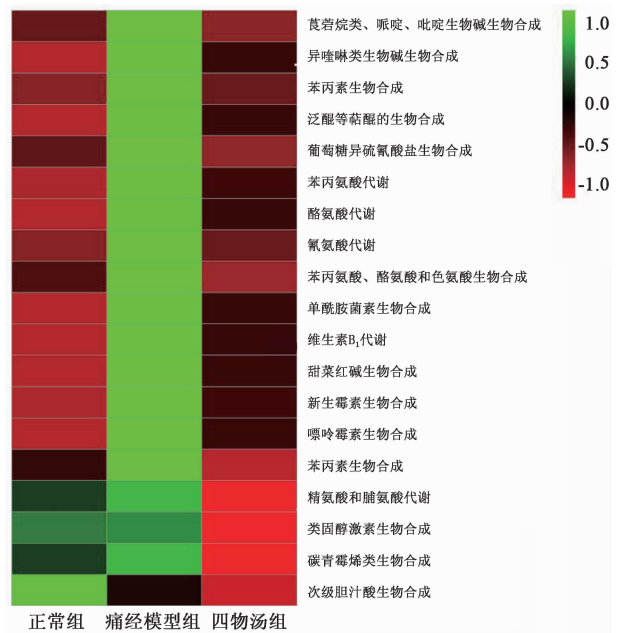


图 7 不同组别代谢通路热图分析

Fig. 7 Heatmap analysis of metabolic pathways of different groups

素 B₁ 代谢通路的活跃程度,以及萘萘烷类、哌啶、吡啶生物碱等次生代谢产物的生物合成有较好的纠正作用,对类固醇激素合成、次级胆汁酸生物合成有显著的抑制作用。

3 讨论

采用代谢组学的方法,整体、动态地研究外源性中药对于机体代谢状态的影响,找出生物标志物和代谢通路,对于揭示中药复方作用机制的“黑箱”具有重要意义。本文揭示了原发性痛经证大鼠模型的内源性生物标记物,探析了给予四物汤后对于原发性痛经证大鼠体内代谢的调节作用。研究表明原发性痛经证大鼠的体内差异生物标记物是黄体酮、牛磺熊去氧胆酸、溶血磷脂酸和 11-脱氧皮甾醇,而四物汤对痛经证的治疗靶点主要是 11-脱氧皮甾醇、溶血磷脂酸,四物汤能显著回调二者在体内的代谢水平;同时,四物汤通过参与体内 *L*-苯丙氨酸,*L*-酪氨酸和 *L*-蛋氨酸代谢而缓解痛经。四物汤对原发性痛经证的治疗作用与类固醇类激素合成、溶血磷脂酸代谢有关,与已有研究报道原发性痛经证的体内生物靶点相吻合;此外,本文还发现四物汤主要通过纠正回调痛经证大鼠体内氨基酸代谢而起到治疗作用,阐明了四物汤多成分、多途径、多靶点治疗原发性痛经证的体内靶点和作用机制,为进一步在分子水平研究其治疗作用奠定了基础。

溶血磷脂酸是近年来发现的一种具有生长因子类物质样活性的脂质小分子,其作为细胞间具有传

导作用的多功能磷脂信使,通过与 G 蛋白受体特异性结合后介导多种信号传导通路,发挥多种生物学效应,如促进平滑肌细胞的收缩、血小板的凝聚等^[14]。溶血磷脂酸能促进环氧化酶-2 的表达^[15]。而环氧化酶-2 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶。研究结果表明痛经模型组与正常组相比,溶血磷脂酸显著升高,促进环氧化酶-2 的表达,增加前列腺素的合成而引起痛经;给予四物汤后,大鼠体内溶血磷脂酸含量显著下降,进而降低体内前列腺素而缓解痛经。

牛磺熊去氧胆酸是由熊去氧胆酸的羧基与牛磺酸的氨基之间缩水而成的结合型胆汁酸^[16],能够抑制肝脏胆固醇的合成,后者在体内能衍生出雌二醇和 11-脱氧皮甾醇等类固醇类激素。研究结果提示痛经模型组与正常组相比,牛磺熊去氧胆酸含量显著下降,其抑制肝脏胆固醇合成的作用降低,使大鼠体内雌二醇和 11-脱氧皮甾醇等类固醇类激素增多,从而导致痛经,与研究结果痛经模型组中 11-脱氧皮甾醇含量显著升高相吻合。四物汤对牛磺熊去氧胆酸的回调作用不明显,但却可以显著回调痛经大鼠中 11-脱氧皮甾醇的相对含量。

L-酪氨酸是甲状腺素、儿茶酚胺、黑素的前体,儿茶酚胺包括去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺。酪氨酸经酪氨酸羟化酶催化,生成 3,4-二羟基苯丙氨酸,左旋多巴再经左旋多巴脱羧酶脱羧基作用,生成多巴胺,再经 β -羟化酶羟甲基化,而后生成去甲肾上腺素^[17]。去甲肾上腺素和多巴胺水平过高也会引发痛经^[18];多巴胺能激活小丘脑室旁核的催产素神经元而增加催产素的释放,催产素不仅直接作用于子宫肌细胞引起子宫收缩,而且还同时刺激内膜细胞释放前列腺素,引起痛经。L-苯丙氨酸经苯丙氨酸羟化酶羟甲基化可生成 L-酪氨酸^[19],也间接参与去甲肾上腺素和多巴胺的代谢。N-苯甲酰甘氨酸,又称马尿酸,是苯丙氨酸的代谢产物。与模型组相比,四物汤组中 L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸的含量显著下降,马尿酸含量显著增加,使去甲肾上腺素和多巴胺的含量随之下降而缓解痛经。

L-蛋氨酸亦称甲硫氨酸,是人体必需氨基酸之一,不能在体内自身生成,必须由外部获得,其主要生理功能为甲基供给,在胆碱、肌酸、赖氨酸、精氨酸及蛋白质分子上的游离羧基的合成过程均需要其提供甲基进行甲基化。L-蛋氨酸可提高机体免疫力,参与免疫细胞、免疫组织和免疫器官的正常生长发育,同时也参与免疫分子(细胞因子、抗体、补体等)

的合成^[20]。研究结果显示给予四物汤后,痛经大鼠体内 L-蛋氨酸显著下降,说明四物汤干预了蛋氨酸代谢。其机制可能是四物汤促进 L-蛋氨酸在蛋氨酰腺苷转移酶的催化下转化要 S-腺苷蛋氨酸,并在 S-腺苷蛋氨酸转甲基酶催化下生成 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),SAH 水平增加影响了蛋氨酸的胱硫醚代谢途径,最终影响了其代谢产物牛磺酸的生产,而牛磺酸能够抑制胆固醇生成,调节抑制性神经递质释放,减少类固醇类激素释放而缓解痛经^[21-22]。

[参考文献]

[1] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 陈庆平, 陈冰鸥, 校注. 北京:中国中医药出版社,1996:207.

[2] 贾梅,郑传柱,张丽,等. 四物汤对急性血瘀模型大鼠活血祛瘀有效部位筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(16):119-123.

[3] 于晓晶. 隔药灸脐法治疗原发性痛经的代谢组学研究[D]. 济南:山东中医药大学,2012.

[4] 郭慧,崔扬,王秋红,等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(1): 213-219.

[5] 李桓,周学平,陆艳. 基于代谢组学的中药配伍减毒研究策略探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8):226-229.

[6] 霍超. 血虚证模型与四物汤反证的代谢组学研究[D]. 北京:军事医学科学院,2011.

[7] 刘培. 四物汤类方用于妇科血瘀证原发性痛经的物质基础与配伍规律研究——香附四物汤的基础研究[D]. 南京:南京中医药大学,2011.

[8] LIU P, DUAN J A, WANG P, et al. Biomarkers of primary dysmenorrhea and herbal formula intervention: an exploratory metabolomics study of blood plasma and urine[J]. Mol Biosyst,2013,9(1):77-87.

[9] LIU P, DUAN J A, GUO J M, et al. Plasma metabolic profiling of normal and dysmenorrhea syndrome rats and the effects of Xiang-Fu-Si-Wu Decoction intervention [J]. Pharm Biol,2014,52(5):603-613.

[10] 周莉江,何瑶. 四物汤对大鼠急性血瘀模型血液流变性作用的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(4): 3-6.

[11] 刘婷婷,何瑶,王丽娟,等. HPLC 同时测定四物汤中 6 种有效成分的含量[J]. 中药材,2016,39(7): 1603-1605.

[12] 何瑶,周莉江,刘婷婷,等. 四物合剂提取纯化过程中不同中间产物补血调经作用研究[J]. 中药材,2016, 39(3):646-649.

[13] Aggio R B, Ruggiero K, Villas-Bôas S G. Pathway Activity Profiling (PAPi): from the metabolite profile to

- the metabolic pathway activity[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(23):2969-2976.
- [14] Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases ciplatin and their role in cisplatin[J]. *Cancer Lett*, 2007, 251(1):1-16.
- [15] 丁萍萍. 溶血磷脂酸在软巢癌发生机制中作用的初步探讨[D]. 济南:山东大学, 2012.
- [16] 王鹏, 朱荣菊. 牛磺熊去氧胆酸的合成进展[J]. *氨基酸和生物资源*, 2013, 35(2):46-50.
- [17] 尚新达. *L*-酪氨酸微生物转化及代谢产物分析鉴定[D]. 郑州:郑州大学, 2014.
- [18] 于晓晶. 隔药灸脐法治疗原发性痛经的代谢组学研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2012.
- [19] 冯蕾. 生物样品中儿茶酚胺类物质分析方法的研究进展[D]. 南昌:南昌大学, 2012.
- [20] 刘文斐, 刘伟龙, 占秀安, 等. 不同形式蛋氨酸对肉中鸡生产性能、免疫指标及抗氧化功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(9):2118-2125.
- [21] Wójcik O P, Koenig K L, Zeleniuchjacquotte A, et al. Temporal reproducibility of taurine measurements in frozen serum of healthy postmenopausal women[J]. *Br J Nutr*, 2010, 104(5):629-632.
- [22] Jänne J, Williams-Ashman H G. Dissociation of putrescine-activated decarboxylation of S-adenosyl-L-methionine from the enzymic synthesis of spermidine and spermine by purified prostatic enzyme preparations[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971, 42(2):222-229.
- [责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
刘春生教授(北京中医药大学)
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
王长虹教授(上海中医药大学)
倪艳教授(山西省中医药研究院)
倪健教授(北京中医药大学)
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
李孝栋教授(福建中医药大学)
康文艺教授(河南大学)
张艳教授(辽宁中医药大学)
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
蔡宇教授(暨南大学药学院)
王冰副教授(上海中医药大学)
袁子民副教授(辽宁中医药大学)
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。