

· 药物代谢 ·

基于 GC-MS 代谢组学分析刺五加总苷提取物的降糖作用

常晋霞¹, 刘文虎^{1*}, 王仕宝², 张建武¹

(1. 川北医学院 基础医学院, 药学院, 四川 南充 637007;

3. 汉中职业技术学院 药学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的:采用 GC-MS 代谢组学分析糖尿病模型小鼠血清代谢物组,并对刺五加总苷提取物的降糖作用进行探讨。方法:建立链脲佐菌素联合四氧嘧啶诱导小鼠糖尿病模型,采用多元分析方法研究小鼠血清代谢物组及变化规律;通过 NIST 11 数据库匹配及对照品指认鉴定差异代谢物;借助代谢组学途径分析(MetPA)数据库分析代谢通路。结果:糖尿病小鼠模型成功复制。刺五加总苷提取物能够降低模型组中棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、丝氨酸的浓度;升高丙氨酸、乳酸、柠檬酸、谷氨酰胺、缬氨酸、甘氨酸、(异)亮氨酸和 β -羟基丁酸的浓度并使之转归。MetPA 富集分析发现 6 条代谢通路与糖尿病关系密切。结论:刺五加总苷提取物具有降糖作用,其机制可能与调节能量代谢、氨基酸代谢、氨基酸生物合成及有机酸代谢相关。

[关键词] 刺五加;总苷;降糖;糖尿病;代谢组学

[中图分类号] R945;R969.1;R284.1;O657.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)16-0101-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160101

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1108.078.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 11:08

Analysis on Antidiabetic Effect of *Acanthopanax senticosus* Total Glycosides Extract by GC-MS Metabonomics

CHANG Jin-xia¹, LIU Wen-hu^{1*}, WANG Shi-bao², ZHANG Jian-wu¹

(1. School of Pharmacy, School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College,

Nanchong 637007, China; 2. School of Pharmacy, Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antidiabetic effect of *Acanthopanax senticosus* total glycosides extract based on GC-MS metabonomics and to explore its mechanism. **Method:** Diabetic mice model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin and alloxan, multivariate statistical analysis was employed to analyze serum metabolites, NIST 11 database and authentic standards were used to analyze and identify differential metabolites, and MetPA was employed to analyze the corresponding metabolic pathways. **Result:** The diabetic mice model was duplicated successfully. After administration of *A. senticosus* total glycosides extract, the levels of metabolites in the model group were detected, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, linoleic acid, tyrosine, phenylalanine, aspartic acid and serine showed decrease; alanine, lactic acid, citric acid, glutamine, valine, iso (leucine), β -hydroxybutyric acid and glycine showed increase, which indicated a tendency towards normality. Pathway enrichment analysis by MetPA displayed that these metabolites were mainly involved in six

[收稿日期] 20170413(006)

[基金项目] 四川省教育厅项目(17ZB0170);川北医学院科研发展计划项目(CBY15-A-ZD10)

[第一作者] 常晋霞, 硕士, 讲师, 从事微生物代谢组学研究, Tel:0817-3352013, E-mail:jinxiachang@163.com

[通讯作者] * 刘文虎, 博士, 副教授, 从事药物代谢组学研究, Tel:0817-3352013, E-mail:lwh790214@163.com

metabolic pathways which therefore were closely related to diabetes. **Conclusion:** *A. senticosus* total glycosides extract displays a significant hypoglycemic effect, which may be achieved by regulation of energy metabolism, amino acid metabolism, amino acid biosynthesis and organic acid metabolism.

[Key words] *Acanthopanax Senticosi* Radix et Rhizoma Seu Caulis; total glycosides; antidiabetic effect; diabetes; metabonomics

糖尿病是一种以高血糖为主要特征,伴有心、脑、肾等靶器官损害的代谢性疾病,主要表现为糖、脂质及蛋白质的代谢紊乱,后期可引起多种严重的并发症。作为一种复杂的代谢性综合疾病,糖尿病很难用单一评价指标来反映其复杂的发病机制。代谢组学作为系统生物学的最下游,通过定量分析生物体受物理、化学、环境等刺激或扰动后内源性代谢物组的改变,来识别和量化机体整体代谢物的动态变化规律,进而阐释疾病的发病过程及药物的作用机制^[1-2]。代谢组学从整体的“生化表型”把握生物体的功能状态,与中药整体观理论一致^[3]。

刺五加性温,味辛、微苦,具有扶正固本、益智安神、补肾健脾之功效。研究表明刺五加根茎中主要活性成分为刺五加总苷。药理研究表明刺五加总苷具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖及防治糖尿病并发症的作用,但关于该有效部位的作用机制尚不明确^[4-5]。本实验拟采用 GC-MS 代谢组学策略研究糖尿病小鼠经刺五加总苷提取物干预后,血清代谢物组及代谢表型的变化,探索该提取物治疗糖尿病的作用机制。

1 材料

7890/5975C 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司), Z326K 型低温超高速离心机(德国 Hermle 公司), BS124S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

刺五加药材购于重庆市沙坪坝区同仁堂药店,经川北医学院药学院刘文虎副教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* 的根茎,标本保存于川北医学院药学院;链脲佐菌素、盐酸甲氧胺(使用前用吡啶配成质量浓度 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(MSTFA)均购自美国 Sigma 公司,四氧嘧啶(合肥博美生物科技有限责任公司),吡啶(成都艾科化工有限公司),十四烷酸、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、乳酸、天冬氨酸、缬氨酸和 β -羟基丁酸、紫丁香苷、刺五加苷 E 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 190039-201001, 140680-201604, 110735-200102, 140705-201403, 140688-

201102, 111577-200201, 110876-200204, 111649-200301, 100911-201501, 140691-201602, 140681-201202, 140783-201102, 111574-200603, 111713-200502, 纯度均 $>99.0\%$), 乙腈、甲酸和甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级昆明种雄性小鼠,体重 $(22 \pm 2) \text{ g}$,由川北医学院实验动物中心提供,饲养环境温度 $(23 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$,恒湿 $(55 \pm 5)\%$, 12 h 光/暗循环,自由饮水,合格证号 SCXK(川)2014-0001,实验动物遵守川北医学院实验动物伦理委员会有关规定,批准号 CBYQSPF/SQ-2015。

2 方法与结果

2.1 刺五加总苷的制备及分析^[6] 计算总苷提取率 1.24%。刺五加总苷分析条件为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 $(4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m})$, 检测波长 265 nm(紫丁香苷)和 210 nm(刺五加苷 E),流动相乙腈-(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 100% ~ 92% B; 6 ~ 18 min, 92% ~ 80% B; 18 ~ 28 min, 80% ~ 75% B; 28 ~ 40 min, 75% ~ 65% B),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 溶液的配制 取紫丁香苷和刺五加苷 E 对照品适量,精密称定,分别加甲醇稀释,制成质量浓度分别为 $0.522, 0.541 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,备用。取紫丁香苷和刺五加苷 E 对照品储备液各 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,得混合对照品溶液,备用。按 2.1 项方法提取刺五加总苷,称取刺五加总苷 1.993 g,加入 10 mL 甲醇,充分溶解,过滤,得供试品溶液,备用。

2.3 糖尿病模型的复制 昆明种小鼠 24 只随机分为空白组(6 只)和糖尿病模型组(18 只)。空白组以普通饲料喂养,模型组以高糖高脂饲料喂养(普通饲料添加 5% 猪油,5% 蛋黄粉和 10% 蔗糖)。6 周后模型组按 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射链脲佐菌素,每天 1 次,连续给药 6 d。末次给药 24 h 后按剂量 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 2% 四氧嘧啶,空白组注射等剂量生理盐水。3 d 后检测模型组小鼠空腹血糖(FBG),将 $\text{FBG} > 11.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的动物用于后续试验。将造模成功的小鼠随机分为刺五加总苷给药

组和模型组,每组 6 只。实验前 12 h 禁食不禁水。称取刺五加总苷提取物 120.08 mg,将其溶解于 12 mL 水中,配成质量浓度 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药液,按剂量 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃 6 d,空白组和模型组给予等体积蒸馏水。

2.4 血样采集与预处理 于末次给药后 2 h 断头采血,收集血液,置于不涂肝素钠离心管中,室温放置 2 h, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清,保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。检测前置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻,取样品 $100 \text{ }\mu\text{L}$,精密加入乙腈 $300 \text{ }\mu\text{L}$,涡旋处理 1 min,于 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清 $200 \text{ }\mu\text{L}$,氮气流吹干。残渣用 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸甲氧胺的吡啶溶液 $80 \text{ }\mu\text{L}$ 复溶, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 肟化反应 90 min,加入 MSTFA [含 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS)] $40 \text{ }\mu\text{L}$,涡旋 30 s, $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 十四烷酸 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 作为内标,涡旋后进样分析。

2.5 血清样品分析条件 色谱条件为 DB-5MS 气相色谱柱 ($0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}, 0.25 \text{ }\mu\text{m}$),进样口温度 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $1 \text{ }\mu\text{L}$,分流比 10:1,程序升温 ($70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min,以速度 $7 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min,以 $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min,以 $7 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min)。质谱条件为电子轰击 (EI) 离子源,离子源温度 $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV ,载气氮气,载气体积流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,采用全扫描模式,扫描范围 m/z 50 ~ 650。

2.6 数据处理及差异代谢物的筛选 GC-MS 数据原始文件经 Xcalibur 4.0 软件转化为 NetCDF 格式。图谱经 XCMS 软件处理后 [XCMS 参数为半峰全宽 (FWHM) = 4, snthresh = 8, max = 20, group (bw = 10)],按内标法进行峰面积归一化处理,将数据导入 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) 在线分析软件,进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)。模式识别数据参数设置为数据转换方式为 none,数据定标方式为 Pareto 标度化 (Pareto scaling),聚类分析采用层次聚类方法中的热点图 (heat maps) [距离测量 (distance measure) 设置为 Euclidean,聚类算法 (clustering algorithm) 设置为均值 (average)]。差异代谢物的筛选流程为①初选平均峰面积 (样本中代谢物峰面积平均值) 之比 >1.5 倍的代谢物;②通过载荷图代谢物的变量权重重要性排序 (variable importance in the projection, VIP) 值识别对分组贡献大的化合物 (VIP >2);③利用 NIST 11 数据库进行

峰检索匹配,匹配相似度 $>80\%$ 的化合物认为匹配成功,对照品指认代谢物;④差异代谢物相对峰面积定量及统计学分析;⑤将鉴定的代谢物导入代谢组学途径分析 (metabolomics pathway analysis, MetPA) 数据库,通过化合物 ID 匹配进行通路分析。以 Fisher 检验和超几何分布对数据在指定生物系统进行随机测试,得到 MetPA 统计数据。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件中单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行数据统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。两两比较采用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

2.8 刺五加总苷的含量分析

2.8.1 线性范围考察 紫丁香苷和刺五加苷 E 为刺五加总苷中含量最高的主要活性成分,故选择紫丁香苷和刺五加苷 E 为指标成分进行方法学考察。取紫丁香苷和刺五加苷 E 对照品工作液,按 2.1 项下分析条件检测,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 18\,376X + 1\,651.4$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 65\,203X + 368.8$ ($r = 0.999\,7$),线性范围分别为 $1.47 \sim 26.52, 1.13 \sim 19.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.8.2 方法学考察 取紫丁香苷和刺五加苷 E 对照品工作液,重复进样 6 次,结果二者峰面积的 RSD 分别为 3.9% 和 2.6%。取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样,每次 $10 \text{ }\mu\text{L}$,结果紫丁香苷和刺五加苷 E 峰面积的 RSD 分别为 4.2% 和 4.4%。取刺五加药材 6 份 (紫丁香苷和刺五加苷 E 质量分数分别为 0.86% 和 0.54%),每份约 1.5 g,分别加入紫丁香苷和刺五加总苷 E 对照品工作液各 1 mL (紫丁香苷和刺五加苷 E 质量浓度分别为 $0.522, 0.541 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),结果平均加样回收率分别为 98.6% 和 99.1%,RSD 分别为 2.3% 和 3.9%。精密量取同一供试品溶液适量,共 6 份,按 2.1 项下条件测定,计算紫丁香苷和刺五加苷 E 在药材中的平均质量分数分别为 0.86% 和 0.54%,RSD 依次为 2.2% 和 2.6%。

2.9 模型验证 通过与空白组 FBG [$(5.22 \pm 1.38) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 相比,模型组 FBG 显著升高 [$(16.48 \pm 1.22) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$],二者差异具有显著统计学意义。模型组给予刺五加总苷提取物干预后,FBG 明显下降 [$(10.10 \pm 0.87) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$],给药组与模型组相比,二者差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明经链脲佐菌素-四氧嘧啶诱导后,糖尿病小鼠模型复制成功。

2.10 小鼠血清总离子流色谱峰的分析 空白组、模型组及刺五加总苷给药组小鼠血清总离子流图见图 1。结果显示 3 组样本的总离子流色谱峰类似,多数代谢物的出峰时间集中在 8~37 min,但在峰信号及峰数目上存在一定差别。如保留时间在 8~

28 min,模型组的峰信号明显强于空白组,且峰的数目相应增多,而药物组的峰信号及峰数介于空白组和模型组之间。表明模型组和空白组二者的代谢轮廓存在一定差异。各色谱峰中代谢物的鉴定情况见表 1。

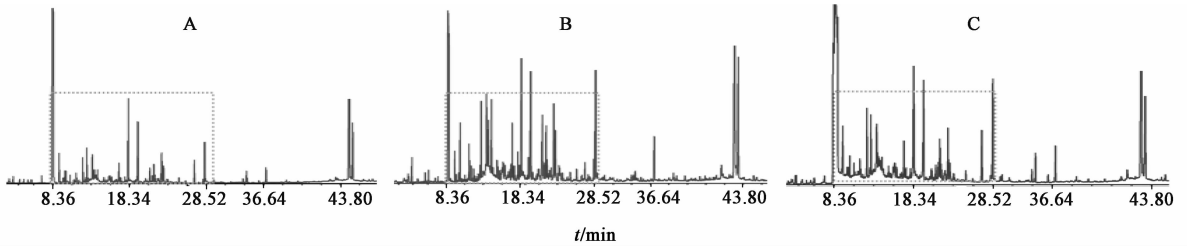


图 1 空白组 (A),模型组 (B) 和刺五加总苷给药组 (C) 小鼠血清的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of mice serum in control group (A), model group (B) and *Acanthopanax senticosus* total glycosides group (C)

表 1 糖尿病小鼠血清差异代谢物的鉴定及变化趋势

Table 1 Identification and variation trend of differential metabolites in diabetes mice serum

t_R/min	代谢物	特征峰 m/z	变化	t_R/min	代谢物	特征峰 m/z	变化
36.72	棕榈酸	313.43	+	19.02	丙氨酸	113.18	-
41.40	硬脂酸	341.52	+	28.82	柠檬酸	264.29	-
41.94	亚油酸	337.41	+	16.75	谷氨酰胺	156.57	-
22.41	酪氨酸	218.18	+	13.52	缬氨酸	144.36	-
26.53	苯丙氨酸	118.81	+	14.66	亮氨酸	158.05	-
17.36	天冬氨酸	231.16	+	14.83	异亮氨酸	158.05	-
22.17	丝氨酸	204.33	+	15.81	甘氨酸	174.49	-
26.78	β -羟基丁酸	156.74	-	12.69	乳酸	73.21	-

注：“+”和“-”分别表示模型组中含量升高和降低的代谢物。

2.11 小鼠血清代谢轮廓分析及药物对代谢谱的影响 为了考察小鼠体内代谢谱的整体变化,采用 PCA 模式识别方法对样本数据进行代谢谱轮廓分析,得到各组样品组内、组间得分图。PCA 能够直观反映出样本间的相似性和差异性,样本间差异越小,代表的点在图中位置就越集中;差异越大,点的位置越分散。由得分图可知,模型组、空白组和刺五加总苷给药组沿第 1,2 主成分方向分开,模型组明显偏离空白组和刺五加总苷给药组,而空白组和刺五加总苷给药组毗邻。表明经刺五加总苷干预后,糖尿病小鼠机体异常代谢向正常状态转归。从热点图得知,刺五加总苷给药组和空白组代谢表型相似,聚为第 1 层次,模型组代谢表型与前二者差异较大,聚为第 2 层次。进一步佐证了刺五加总苷提取物对糖尿病小鼠的治疗作用。见图 2。

2.12 差异代谢物的鉴定 依据 2.6 项下方法筛选差异代谢物并对其进行鉴定。结果发现对区分正常组和模型组样本贡献较大的代谢物包括棕榈酸,硬

脂酸,亚油酸,酪氨酸,苯丙氨酸,丝氨酸,天冬氨酸, β -羟基丁酸,丙氨酸,乳酸,柠檬酸,谷氨酰胺,缬氨酸,甘氨酸和(异)亮氨酸。这些代谢物可能承载着糖尿病代谢过程的主要信息。与空白组相比,模型组中苯丙氨酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、天冬氨酸、丝氨酸和酪氨酸浓度显著增加; β -羟基丁酸、丙氨酸、谷氨酰胺、乳酸、柠檬酸、甘氨酸、缬氨酸和(异)亮氨酸浓度显著降低。药物干预后,模型组中代谢物的水平均向正常状态呈现不同程度的转归,见图 3,尤其是 β -羟基丁酸、柠檬酸、谷氨酰胺、缬氨酸的浓度基本达到正常水平。表明刺五加总苷提取物对上述代谢物具有较好的调节作用。

2.13 差异代谢物的 MetPA 分析 将鉴定的 16 种差异代谢物导入 MetPA 数据处理中心进行通路富集分析,见图 4,图中每个圆圈对应糖尿病相关的通路,圆圈的着色代表 P 大小, P 越小,着色越深;反之,着色越浅。通过对 P ,霍尔姆检验(Holm P),误判率(FDR)及通路影响值(pathway impact)的综合

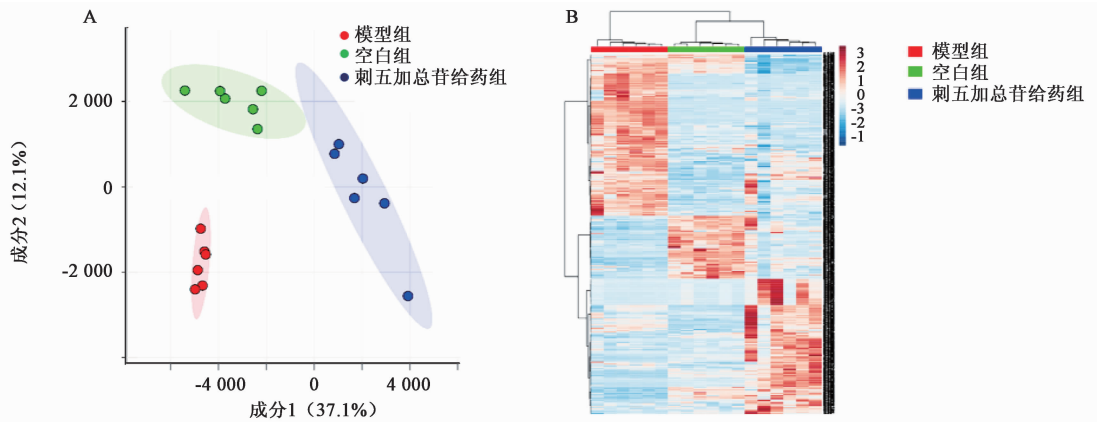
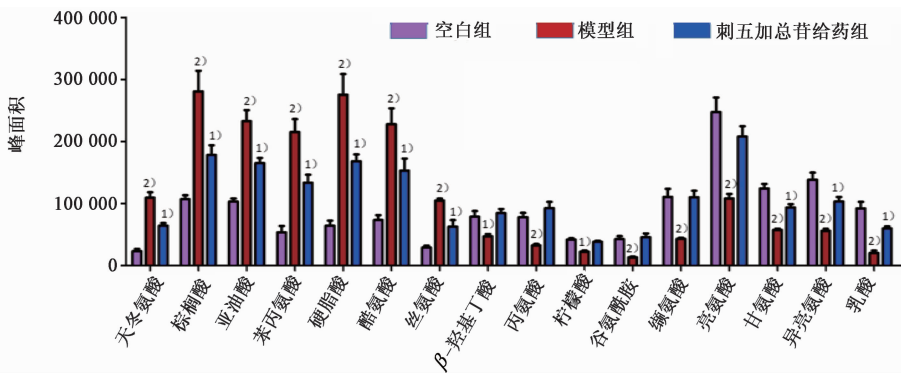


图 2 模型组,空白组及刺五加总苷给药组小鼠血清的 PCA 得分(A)和热点(B)

Fig. 2 PCA plots (A) and heat maps (B) of mice serum in control group, model group and *Acanthopanax senticosus* total glycosides group



与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

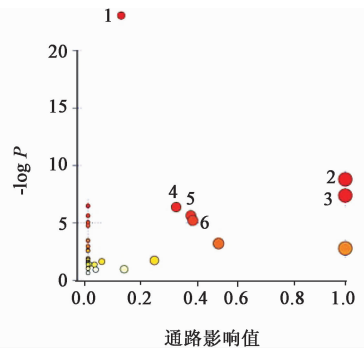
图 3 刺五加总苷提取物对小鼠血清差异代谢物的影响

Fig. 3 Effect of *Acanthopanax senticosus* total glycosides extract on differential metabolites in mice serum

分析,对糖尿病相关代谢通路的重要性进行了系统评价,综合上述因素,剔除 $P > 0.05$, Holm $P > 0.1$, $FDR > 0.1$ 和 $pathway\ impact < 0.1$ 的通路,最终发现 6 条通路与糖尿病关系密切,见表 2。这些代谢通路分别为氨酰-tRNA 合成、缬氨酸-(异)亮氨酸合成、苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸合成、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酰胺代谢、苯丙氨酸代谢和能量代谢。表明糖尿病小鼠体内发生了上述代谢过程。

3 讨论

刺五加为传统名贵药材,具有良好的降糖和预防糖尿病并发症的疗效,但其作用机制尚不明确。本研究采用 GC-MS 代谢组学技术对链脲佐菌素联合四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠血清样本进行代谢谱分析。通过多种方法鉴定了 16 个差异代谢物(包括氨基酸、脂肪酸和有机酸)。这些代谢物在糖尿病小鼠血清中显著上调或下调,表明糖尿病小鼠体内发生了代谢紊乱。经刺五加总苷提取物干预后,上述代谢物水平向正常状态发生不同程度的转归,表明刺五加总苷对糖尿病小鼠具有一定治疗作用。



1. 氨酰-tRNA 合成; 2. 缬氨酸-(异)亮氨酸合成; 3. 苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸合成; 4. 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酰胺代谢; 5. 苯丙氨酸代谢; 6. 能量代谢

图 4 糖尿病小鼠差异代谢物的 MetPA 代谢通路分析

Fig. 4 MetPA pathway analysis of differential metabolites in diabetic mice

通路富集表明这些代谢物在体内主要涉及能量代谢、氨基酸代谢、氨基酸生物合成及有机酸代谢等途径。

3.1 能量代谢 能量代谢是机体物质代谢过程中伴随的能量转移和利用,糖尿病机体伴随能量代谢

表 2 差异代谢物 MetPA 通路中 6 条与糖尿病关系密切的通路分析

Table 2 Analysis of six pathways of differential metabolites in MetPA pathway associated with diabetes

通路名称	差异代谢物 匹配情况	P	Holm P	FDR	pathway impact
氨酰-tRNA 合成	10/69	3.34×10^{-11}	2.74×10^{-9}	2.74×10^{-9}	0.13
缬氨酸-(异)亮氨酸合成	3/11	1.21×10^{-4}	0.010	0.005	0.99
苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸合成	2/4	5.38×10^{-4}	0.043	0.014	1.00
丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢	3/24	1.00×10^{-3}	0.080	0.022	0.34
苯丙氨酸代谢	2/11	4.00×10^{-3}	0.035	0.048	0.41
能量代谢	3/12	7.00×10^{-3}	0.052	0.036	0.52

的紊乱。与空白组相比,与能量代谢有关的代谢物在模型组中显著下降,包括柠檬酸、乳酸和丙氨酸。柠檬酸是三羧酸循环的中间产物,乳酸是糖酵解过程中葡萄糖无氧降解的产物,丙氨酸参与多种代谢过程,也是能量来源重要物质之一。这些代谢物在模型组显著降低,提示糖尿病机体能量代谢失衡,这一结论与文献报道一致^[7-8]。

3.2 氨基酸代谢 体内氨基酸多数为生糖或(和)生酮氨基酸,可作为三羧酸循环的底物参与糖异生。某些氨基酸如亮氨酸可以在无葡萄糖和其他氨基酸存在的条件下,通过激活某些信号通路促使胰岛素释放,如抑制腺苷活化蛋白激酶(AMPK),激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白-核糖体 S6 蛋白激酶 1(mTOR-S6K1)信号通路等^[9]。谷氨酰胺能促使亮氨酸进入胰岛细胞,协助降糖^[10]。本实验中模型组经刺五加总苷提取物干预后,血清中谷氨酰胺浓度显著升高,与文献报道一致^[10]。报道称缬氨酸可增强组织对葡萄糖的有效利用,其机制可能与氧化应激有关^[11]。本研究中苯丙氨酸在模型组中的代谢水平显著升高,这可能与糖尿病小鼠体内瘦素水平增加有关,血液中高水平的瘦素可引起氧化应激,进而导致胰岛素抵抗^[12-13]。刺五加总苷提取物能够有效降低模型组苯丙氨酸水平,其机制可能与调节瘦素水平有关。总之,氨基酸作为重要生理活性物质参与了许多与糖代谢相关的代谢通路。但目前对氨基酸调控糖代谢的具体机制了解甚少,多数氨基酸生物功能与糖尿病的关联性仍需深入研究。

3.3 脂肪酸代谢 游离脂肪酸是构成血脂的基本单元,血清中脂肪酸水平增高,容易受到糖代谢、脂肪代谢的影响。血液中脂肪酸长期处于高水平状态将导致胰岛细胞的分泌功能障碍和细胞凋亡增加,还可引起胰岛素抵抗,加重糖尿病的病理改变^[14]。棕榈酸、硬脂酸和亚油酸在糖尿病机体中含量升高

将进一步增加氧化应激能力^[15]。有报道称氧化应激主要通过 2 种机制诱发糖尿病:①能够对胰岛 β 细胞的正常功能造成损伤,主要表现为线粒体结构破坏;激活核转录因子- κ B(NF- κ B)信号;引起细胞炎症反应;抑制能量代谢及减少胰岛素合成和分泌^[16-17];②诱发胰岛素抵抗,通过干扰胰岛素受体和胰岛素受体底物的磷酸化,进而影响磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)通路的活化,抑制葡萄糖转运子-4(GLUT4)的转位以及损伤细胞骨架等与胰岛素信号传递有关的生理活动^[18-19]。本研究中检测的 3 种脂肪酸在糖尿病小鼠体内升高与文献报道一致,可能与参与上述调节过程有关。

代谢组学的研究对象为内源性小分子代谢物组,这些小分子物质作为生命体所有基因、蛋白功能活动的终点,承载着机体生理病理变化的重要信息^[20]。因此,研究小分子代谢物更有助于全面理解疾病发生、发展中的变化规律。然而,由于内源性代谢物数目繁多、性质各异,因此采用一种分析技术不可能全面检测机体代谢物谱的所有特征。目前,本课题组正采用不同的分析手段对刺五加提取物干预糖尿病小鼠的血清、尿液进行系统研究,为刺五加治疗、预防糖尿病的机制分析提供理论基础。

[参考文献]

[1] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: metabolomics [J]. Nature, 2008, 455 (7216): 1054-1056.
 [2] Newgard C B. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? [J]. Cell Metab, 2017, 25 (1): 43-56.
 [3] 王玉龙,吕光耀,王娅妮,等.基于¹H-NMR的丹七片对自发性高血压大鼠尿液代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(4):102-107.
 [4] HUANG L, ZHAO H, HUANG B, et al. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology

- [J]. Pharmazie, 2011, 66(2): 83-97.
- [5] LI T, Ferns K, YAN Z Q, et al. *Acanthopanax senticosus*: photochemistry and anticancer potential [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(8): 1543-1558.
- [6] 邵佳锋, 刘树民, 牟洪, 等. 刺五加根及根茎中紫丁香苷、刺五加苷 E 的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 5-7.
- [7] Macdonald I A. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes [J]. Eur J Nutr, 2016, 55(Suppl 2): 17-23.
- [8] Hernández E A, Kahl S, Seelig A, et al. Acute dietary fat intake initiates alterations in energy metabolism and insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2017, 127(2): 695-708.
- [9] Saha A K, XU X J, Lawson E, et al. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle [J]. Diabetes, 2010, 59(10): 2426-2434.
- [10] Nicklin P, Bergman P, ZHANG B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy [J]. Cell, 2009, 136(3): 521-534.
- [11] ZHANG S, ZENG X, REN M, et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2017, doi: 10.1186/s40104-016-0139-z.
- [12] Stefanovic A, Kotur-stevuljevic J, Spasic S, et al. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 799(1): 156-163.
- [13] Naito M, Fujikura J, Ebihara K, et al. Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice [J]. Diabetes, 2011, 60(9): 2265-2273.
- [14] Lopaschuk G D. Fatty acid oxidation and its relation with insulin resistance and associated disorders [J]. Ann Nutr Metab, 2016, 68(Suppl 3): 15-20.
- [15] Cree-Green M, Gupta A, Coe G V, et al. Insulin resistance in type 2 diabetes youth relates to serum free fatty acids and muscle mitochondrial dysfunction [J]. J Diabetes Complications, 2017, 31(1): 141-148.
- [16] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [17] ZHANG X, BAO Y, KE L, et al. Elevated circulating free fatty acids levels causing pancreatic islet cell dysfunction through oxidative stress [J]. J Endocrinol Invest, 2010, 33(6): 388-394.
- [18] Henriksen E J, Diamond-Stanic M K, Marchionne E M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(5): 993-999.
- [19] Rains J L, Jain S K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(5): 567-575.
- [20] 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.

[责任编辑 刘德文]