

· 药物代谢 ·

基于尿液代谢组学技术分析大川芎方多组分中药制剂干预急性偏头痛大鼠模型的影响

马诗瑜^{1,2}, 沈岚^{1,3*}, 林晓^{1,3}, 冯怡³

(1. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203;

2. 上海交通大学 医学院 附属瑞金医院, 上海 200012;

3. 上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 考察大川芎方多组分中药制剂对急性偏头痛大鼠尿液中内源性代谢产物的影响, 通过尿液代谢组学技术探讨该药可能的作用机制。**方法:** 采用40只SD雄性大鼠随机分为5组, 分别为正常组、模型组和大川芎方多组分中药制剂低、中、高剂量组(0.19, 0.37, 0.74 g·kg⁻¹), 每组8只。除正常组外, 其余各组大鼠采用皮下注射10 mg·kg⁻¹硝酸甘油方法制备急性偏头痛的模型。造模成功后, 大川芎方多组分中药制剂组灌胃给予不同剂量的大川芎方多组分中药制剂。给药0.5 h后腹主动脉取血, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆中血清素5-羟色胺(5-HT), 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA), 一氧化氮(NO), 一氧化氮合酶(NOS), 降钙素基因相关肽(CGRP)及多巴胺(DA)含量; 采用免疫组化对正常组及模型组大鼠下丘脑和脑干部位5-HT和NOS蛋白表达进行分析, 并通过平均光密度值进行统计; 采用UPLC-TOF/MS, 结合主成分分析(PCA)对不同组别大鼠进行尿液代谢组学分析, 并发现潜在的生物标记物; 通过MetaboAnalyst 3.0软件对差异代谢物进行代谢通路分析。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠体内的神经递质均有极显著性差异($P < 0.01$), 说明急性偏头痛大鼠模型已建立; 与模型组比较, 各给药组体内的神经递质均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明给予大川芎方多组分中药制剂可调节大鼠体内的神经递质含量。根据UPLC-TOF/MS分析, 共发现10种潜在的差异代谢物。大川芎方多组分中药制剂给药可降低模型组中色氨酸、缬氨酸的含量, 升高 γ -氨基丁酸(GABA), 乳酸, β -羟丁酸的含量。根据代谢通路预测研究, 发现相关性较大的代谢通路为丙氨酸、天冬氨酸与谷氨酸代谢, 丙酸代谢, 氮代谢及色氨酸代谢。**结论:** 大川芎方多组分中药制剂对急性偏头痛大鼠模型体内的差异代谢物有一定的回调作用, 其作用机制主要与氨基酸代谢有关, 特别是犬尿氨酸的代谢。

[关键词] 大川芎方; 多组分中药制剂; 代谢组学; 急性偏头痛; 氨基酸代谢

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0101-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191705

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1654.007.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 11:19

Intervention Effect of Dachuanxiong Fang Multi-component Preparation on Acute Migraine Rat Model by Urine Metabolomics

MA Shi-yu^{1,2}, SHEN Lan^{1,3*}, LIN Xiao^{1,3}, FENG Yi³

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200012, China;

3. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of TCM under Ministry of Education, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intervention effect of Dachuanxiong Fang multi-component preparation on acute migraine rats, in order to explore the possible mechanism by using urine metabolomics

[收稿日期] 20190102022

[基金项目] 上海市中医药科技创新项目(ZYKC201703003)

[第一作者] 马诗瑜, 硕士, 药师, 从事化学计量学和医院药学研究, Tel: 021-64370045, E-mail: may7679@163.com

[通信作者] * 沈岚, 博士, 教授, 从事中药制剂关键技术及体内过程研究, Tel: 021-51323030, E-mail: alansusu@sina.com

technology. **Method:** The forty SD rats were randomly divided into 5 groups ($n = 8$), control group, model group, low-dose Dachuanxiong Fang multi-component preparation (DCXF) group ($0.19 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium-dose DCXF group ($0.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-dose DCXF group ($0.74 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Rats were subcutaneously injected with $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nitroglycerin for modeling, and Dachuanxiong Fang multi-component preparation was administered through intragastric administration. After half an hour of administration, blood was collected from the abdominal aorta, and the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA), nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), calcitonin gene related peptide (CGRP), dopamine (DA) in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The contents of 5-HT and NOS in the hypothalamus and brainstem of the control group and the model group were analyzed, and the average optical density value was used for statistical analysis. UPLC-TOF/MS combined with principal component analysis (PCA) analysis was used to analyze different groups of rats and discover differential metabolites. Differential metabolites were analyzed by MetaboAnalyst 3.0 software for possible metabolic pathways. **Result:** After modeling, compared with the control group, the content of neurotransmitters in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). After the intervention with Dachuanxiong Fang multi-component preparation, compared with the model group, the content of neurotransmitters was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Based on UPLC-TOF/MS analysis, 10 potential biomarkers were found. After the intervention with Dachuanxiong Fang multi-component preparation, the contents of tryptophan and proline were down-regulated, while the contents of gamma-aminobutyric acid (GABA), lactic acid and β -hydroxybutyrate showed an upward trend. According to the metabolic pathway prediction study, metabolic pathways with a higher correlation were found to be alanine, aspartic acid and glutamate metabolism, propionic acid metabolism, nitrogen metabolism and tryptophan metabolism. **Conclusion:** The possible metabolism pathway of Dachuanxiong Fang multi-component preparation is mainly amino acid metabolism in urine, and kynurenine is also the product of tryptophan metabolism pathway. The kynurenine metabolic pathway is also one of the main pathways of tryptophan metabolism.

[Key words] Dachuanxiong Fang; multi-component Chinese medicine preparation; metabolomics study; acute migraine; tryptophan metabolism

偏头痛是一种常见、急性发作的神经血管型疾病,临床表现主要为一侧或双侧搏动性的疼痛或伴有闪光点、厌食、畏光、恶心、腹泻等症状^[1-2]。目前,其发病机制尚不明确。大川芎方源于金·刘完素《宣明论方》,由川芎、天麻组成,为治疗偏头痛的经典中药复方。

目前中药“多组分、多靶点”的作用已被广泛认知,然而依靠单线条药效学实验难以证实中药多组分的作用。因此,代谢组学的整体及系统研究方法已被广大中医药研究者认为是阐述中药学整体观念较为适宜的研究方法之一^[3-5]。有关治疗偏头痛方面的组学研究主要涉及 2 方面,一方面是关于针刺治疗偏头痛的患者及硝酸甘油模型大鼠的特定穴位后^[6-7],其体内¹H-NMR 代谢指纹谱的研究,研究显示偏头痛患者血浆中的兴奋性氨基酸增加、脂类代谢增强、糖代谢增强;而在硝酸甘油诱导的大鼠血浆中,兴奋性氨基酸增加较为显著。另一方面为有关口服用药后偏头痛代谢组学相关研究,包括关于

天麻-川芎药对偏头痛大鼠尿液代谢组学的研究^[8],共找到 9 个内源性代谢物,认为其中色氨酸、琥珀酸、酪氨酸与偏头痛发作过程最为密切;关于正天丸对偏头痛大鼠血浆代谢组学研究中^[9],发现磷脂酰胆碱,3,4-二羟苯基乙二醇对阐释偏头痛代谢组学机制最为相关。

因此,本文以大川芎方多组分中药制剂(DCXF)为研究对象,采用皮下注射硝酸甘油法建立急性偏头痛大鼠模型,借助代谢组学技术分析给药后 DCXF 尿液中代谢物的变化趋势,寻找潜在的差异代谢物,聚焦分析可能干预大鼠急性偏头痛的作用通路,为合理阐释大川芎方抗偏头痛的作用提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 SD 雄性大鼠 40 只,体质量(200 ± 20) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。本实验中经过上海中医药大学动物伦理委员会批准(批准号为

ZY201609010),符合实验动物伦理委员会指导原则。

1.2 药物与试剂 DCXF[自制,批次为 20131030,采用挤出滚圆法制备,其中川芎调释微丸与天麻调释微丸配比为 4:9,有效成分阿魏酸与天麻素含量分别为 (1.11 ± 0.03) , $(0.51 \pm 0.01)g \cdot kg^{-1}$]。LC-MS 级乙腈(美国 J. T. Baker 公司),HPLC 级甲醇(德国 Merck 公司),甲酸(瑞士 Fluka 公司),其他试剂均为市售分析纯,超纯水 Milli-Q 系统(美国 Millipore 公司)。硝酸甘油注射液(北京益民药业有限公司,批号 20160122)。一氧化氮合酶(NOS),血清素(5-HT)抗体,免疫组化用 DAB 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA0121,BA0360,AR1022);大鼠血清素(5-HT),5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA),一氧化氮(NO),一氧化氮合酶(NOS),降钙素基因相关肽(CGRP),多巴胺(DA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号分别为 XY-E30326,XY-E11330,XY-E10868,XY-E30336,XY-E30375,XY-E30401)。

1.3 仪器 Waters Acquity™ 型超高效液相色谱系统(配高压二元梯度泵、二极管阵列检测器和可控温自动进样器),Waters Premier TOF 型质谱检测采用飞行时间质谱仪(配有 ESI 电离源接口和 Lock-spray 接口)(美国 Waters 公司);FA1004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SK52004 型超声清洗装置(上海科导超声仪器有限公司);TGL-16B 型高速离心机,WGP-9030 型隔水式恒温培养箱(上海安亭科学仪器厂);BS124S 型电子天平[塞多科科学仪器(北京)有限公司]。

2 方法

2.1 造模与分组 40 只雄性 SD 大鼠,在实验环境[温度 $(23 \pm 2)^\circ C$,湿度 $(50 \pm 5)\%$]下适应性饲养 7 d,称体质量。根据体质量将大鼠随机分为正常组,模型组,DCXF 低、中、高剂量组,每组均为 8 只动物,实验前禁食 12 h(自由饮水),模型组及 DCXF 各剂量组采用皮下注射硝酸甘油注射液 $(10 mg \cdot kg^{-1})$ 建立急性偏头痛大鼠模型^[10-12]。

2.2 给药 DCXF 组分别给予剂量为 0.19,0.37,0.74 $g \cdot kg^{-1}$ 的混悬液(分别为临床剂量的 1/2,1,2 倍)。除正常组外,其余组在造模 30 min 后给予各自的药物,给药量为 $10 mL \cdot kg^{-1}$ 。正常组给予相同给药量 $(10 mL \cdot kg^{-1})$ 的生理盐水。

2.3 ELISA 检测 血浆样品中 5-HT,5-HIAA,NO,NOS,CGRP,DA 的含量 于末次给药 30 min 后,各

组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉 $(3 mL \cdot kg^{-1})$,腹主动脉取尽血,取 2 mL 加入含 1% 的肝素钠离心管中,静止 $3\ 500 r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,分离血浆,采用 ELISA 检测,具体步骤按照各个试剂盒说明书进行。

2.4 免疫组化检测 NOS 和 5-HT 的表达 大鼠取血后,开胸经左心室弓主动脉插管,剪开右心耳,以 $4^\circ C$ 预冷的生理盐水 100 mL 快速冲洗,继而灌注 $4^\circ C$ 预冷的 4% 多聚甲醛固定液 250 mL。断头取脑后组织修块,再次用 4% 多聚甲醛固定,取大鼠下丘脑和脑干部分组织,各样本平行操作,采用预冷的 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋。组织切片后脱蜡至水,NOS 和 5-HT(1:400)抗体 $4^\circ C$ 孵育过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 50 min,洗涤,DAB 显色,苏木精复染细胞核,脱水封片后显微镜镜检并采集图像,采用 Image J 分析平均积分吸光度 IA,为测量准确,在 Image J 中设定了图片黑白反转,因此染色较为明显的正常组平均光密度值反而更低。

2.5 尿液代谢组学 UPLC-Q-TOF-MS 分析

2.5.1 尿液样品前处理 大鼠取血后,用注射器吸取膀胱中的尿液,合并各组的尿液置于干燥离心管中, $4^\circ C$ 下 $3\ 500 r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min;取尿样上清液 100 μL ,加入甲醇 200 μL ,涡旋 2 min, $4^\circ C$ 条件下 1 万 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min,涡旋 2 min,取上清液置于进样小瓶中。

2.5.2 液相条件 色谱柱采用 Acquity™-BEH C_{18} 型反相分析柱 $(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 \mu m)$,美国 Waters 公司,流动相为 0.1% 甲酸水溶液-1% 乙腈(A)和纯乙腈-0.1% 甲酸-1% 水(B),流速 $0.4 mL \cdot min^{-1}$,自动进样器温度设定 $4^\circ C$,氮气为载气。采用梯度洗脱方式,设置如下,尿液正离子为 0~1 min(1%~15% B),1~5 min(15%~30% B),5~8 min(30%~80% B),8~9 min(80%~100% B),9~11 min(100% B),11~13 min(100%~1% B);尿液负离子:0~1 min(1%~10% B),1~5 min(10%~25% B),5~7 min(25%~50% B),7~9 min(50%~100% B),9~11 min(100% B),11~13 min(100~1% B)。

2.5.3 质谱条件 质谱分析检测参数:脱溶剂气流量 $650 L \cdot min^{-1}$,脱溶剂气温度 $350^\circ C$,锥孔气流量 $50 L \cdot h^{-1}$,离子源温度 $110^\circ C$,毛细管电压 3 000 V,正离子模式采用锥孔电压 35 V,负离子模式采用锥孔电压 55 V,质量校准选择“DRE”模式,取 LEA

“ $A + 1$ ”和“ $A - 1$ ”同位素峰(正离子 m/z 556.277 1), (负离子 m/z 554.261 5)作为质量校准峰。质谱图平均扫描速率设为 $0.28 \sim 0.02 \text{ amu} \cdot \text{s}^{-1}$, 质量扫描 m/z 50 ~ 1 000, 每次进样 $5 \mu\text{L}$, 样品运行按照随机顺序进行。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析, 在方差齐性的情况下, 组间两两比较采用 LSD 检验; 在方差不齐的情况下, 使用不等方差假设项下的 Tamhane's T^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。质谱数据处理采用美国 Waters 公司 Masslynx 软件进行色谱峰自动识别、

峰匹配、峰对齐、峰提取和归一化处理, 再将数据导入 SIMCA-P 12.0 进行 PCA 数据分析。

3 结果

3.1 DCXF 对急性偏头痛大鼠模型中血浆 NO, NOS, 5-HT, 5-HIAA, CGRP, DA 的影响 造模结束后, 与正常组比较, 模型组大鼠血浆中 5-HT, 5-HIAA, CGRP, DA, NO, NOS 水平均显著升高 ($P < 0.01$), 说明造模成功; 与模型组比较, 各给药组大鼠血浆中 5-HT, 5-HIAA, CGRP, DA, NO, NOS 水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明给药后可调节大鼠血中的相关神经递质含量。见表 1。

表 1 DCXF 对急性偏头痛大鼠模型中血浆 NO, NOS, 5-HT, 5-HIAA, CGRP, DA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of DCXF on NO, NOS, 5-HT, 5-HIAA, CGRP, DA levels of neurotransmitters in acute migraine rats model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	5-HIAA/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	CGRP/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	DA/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	205.17 ± 4.18	10.39 ± 0.39	24.29 ± 1.26	41.56 ± 1.52	22.47 ± 1.22	18.22 ± 0.93
模型	-	368.25 ± 3.36 ¹⁾	16.12 ± 0.67 ¹⁾	40.45 ± 3.09 ¹⁾	83.24 ± 5.54 ¹⁾	36.47 ± 1.36 ¹⁾	28.02 ± 1.11 ¹⁾
DCXF	0.19	245.86 ± 8.53 ³⁾	13.01 ± 0.50 ³⁾	31.00 ± 1.12 ³⁾	54.36 ± 2.29 ³⁾	25.18 ± 0.90 ³⁾	20.19 ± 0.95 ³⁾
	0.37	287.98 ± 7.08 ³⁾	14.52 ± 0.48 ³⁾	37.41 ± 1.66 ²⁾	67.01 ± 7.47 ³⁾	28.54 ± 0.86 ³⁾	22.68 ± 0.56 ³⁾
	0.74	318.26 ± 9.37 ³⁾	15.58 ± 0.39 ²⁾	38.18 ± 1.49 ²⁾	75.84 ± 6.15 ²⁾	32.42 ± 1.38 ³⁾	24.92 ± 0.92 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 急性偏头痛大鼠模型对大脑不同部位 5-HT 和 NOS 抗体表达的影响 硝酸甘油所致的急性偏头痛大鼠模型中 5-HT 和 NOS 在脑干及下丘脑中表达均显著下降且呈现特异性分布, 说明硝酸甘油致急性偏头痛模型已建立。模型组各亚组平均 IA 均高于正常组 ($P < 0.05$)。即与正常组比较, 造模后大鼠脑组织部位两者的表达均下降, 表明硝酸甘油致急性偏头痛模型已建立。见图 1, 表 2。

3.3 不同组别大鼠代谢轮廓分析 采用 SIMCA-P 软件对 Masslynx 软件处理的正常组, 模型组, DCXF 组数据进行 PCA 分析。将每组同一时间点采集的尿液合并后进行检测, 由上述 PCA 图可知, 模型组数据均已经偏离了正常组数据, 而给药后各组有向正常组回调的趋势。其中大川芎方多组分剂剂不同剂量组均有回调趋势, 且逐渐趋近于正常组。结果表明, 正常组和模型组间内源性代谢物的含量存在明显差异, 给予 DCXF 干预后, 异常代谢现象有所改善。见图 2, 3。

3.4 潜在生物标志物的指认 对数据进一步分析, VIP 值越大对分组的贡献也越大, 利用 $VIP > 1$ 再结合 Fold Change 的比值变化, 筛选出 Fold Change (model/control) > 0.4 倍的化合物被认为对模型有

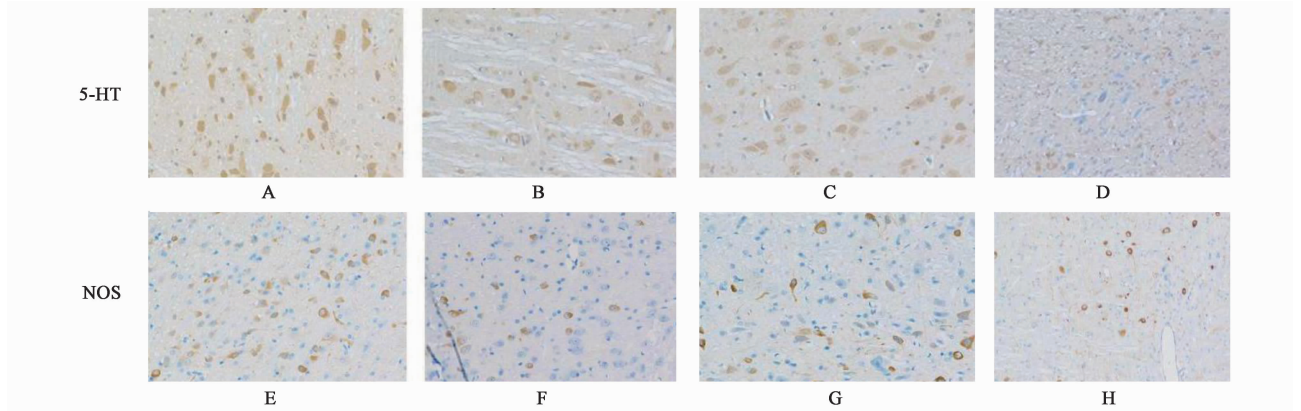
表 2 急性偏头痛大鼠模型对大脑不同部位 5-HT 和 NOS 抗体表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of model group in different brain tissues on expression of 5-HT and NOS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	亚组	平均 IA
脑干正常	5-HT	0.371 ± 0.011
	NOS	0.324 ± 0.029
脑干模型	5-HT	0.414 ± 0.019 ¹⁾
	NOS	0.512 ± 0.082 ¹⁾
下丘脑正常	5-HT	0.384 ± 0.049
	NOS	0.365 ± 0.086
下丘脑模型	5-HT	0.480 ± 0.036 ¹⁾
	NOS	0.430 ± 0.013 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

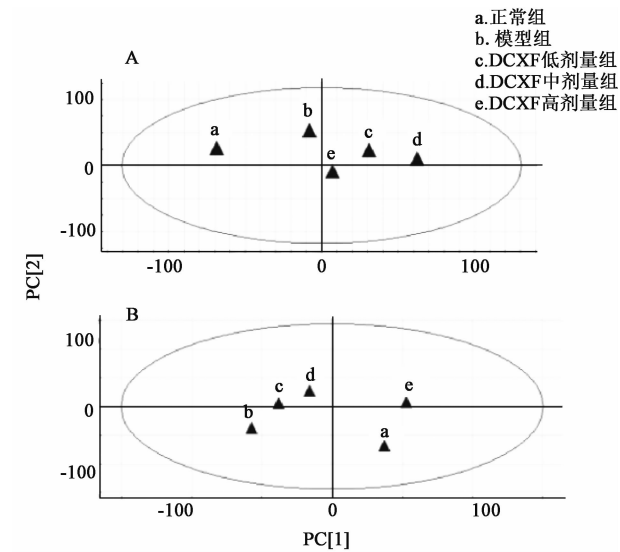
显著贡献。对正常组、模型组和 DCXF 高剂量组分析, 正离子模式找到 7 个具有显著差异的代谢物, 负离子模式找到 3 个具有显著差异的代谢物。然后利用公共数据库 KEGG 和 HMDB 等对化合物进一步鉴定。相对于正常组, 急性偏头痛模型组大鼠体内的色氨酸 (tryptophan), 酪氨酸 (tyrosine), 缬氨酸 (valine), 犬尿氨酸 (kynurenine), 犬尿喹啉酸



A. 正常组大鼠脑干; B. 模型组大鼠脑干; C. 正常组大鼠下丘脑; D. 模型组大鼠下丘脑; E. 正常组大鼠脑干; F. 模型组大鼠脑干; G. 正常组大鼠下丘脑; H. 模型组大鼠下丘脑

图 1 大鼠脑干及下丘脑 5-HT, NOS 抗体表达 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Rat brainstem and rathypothalamus sections were immunostained with antibodies of 5-HT and NOS (IHC, ×200)



A. 正离子模式; B. 负离子模式 (图 3 同)

图 2 各组大鼠尿液的 PCA 得分

Fig. 2 PCA score map of urine at positive and negative ion for each group

(kynurenic acid) 呈显著上升趋势。 γ -氨基丁酸 (GABA), 乳酸, β -羟丁酸 [(R)-3-hydroxybutyric acid], 琥珀酸 (succinic acid), 谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 呈下降趋势。在给予大川芎方多组分制剂干预后, 其体内的色氨酸、缬氨酸等发生下调, GABA, 乳酸, β -羟丁酸等呈现上调趋势。同时, 发现色氨酸, GABA, 乳酸, β -羟丁酸, 琥珀酸, 犬尿氨酸, 犬尿喹啉酸等代谢水平, 逐渐接近正常状态。见表 3。

3.5 代谢通路分析 为了进一步探究大川芎方多组分制剂治疗偏头痛的可能机制, 将上述潜在差异代谢物导入 MetaboAnalyst 3.5 以分析代谢通路。最有显著性意义的代谢通路分别为丙氨酸, 天冬

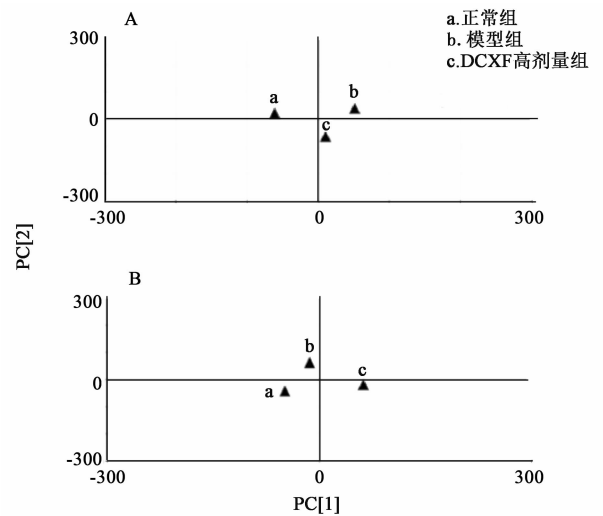


图 3 各组大鼠尿液的 PCA 得分

Fig. 3 PCA score map of urine at positive and negative ion for each group

氨酸和谷氨酸代谢、氨酰基-tRNA 生物合成通路、丙氨酸代谢、氮代谢、色氨酸代谢、苯丙氨酸, 酪氨酸和色氨酸生物合成。见图 4 及表 4。

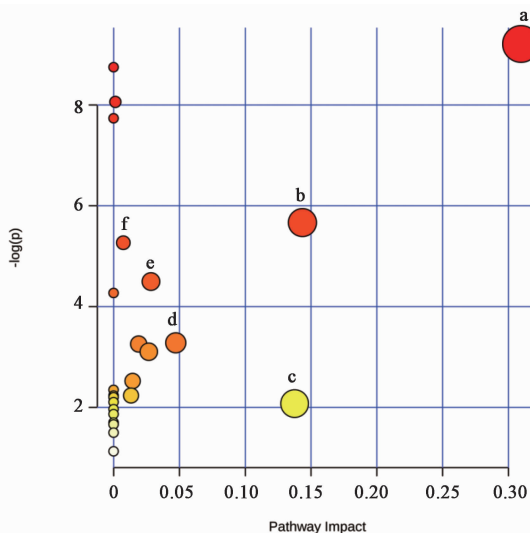
4 讨论

多组分中药制剂是中药现代化研究的热点之一, 其关键在于如何保持与原方药效的一致性。本课题组^[10-12] 对大川芎方治疗偏头痛的物质基础进行了提取、纯化研究, 使效应组分得到较高程度的富集, 得到了大川芎方效应组分, 即川芎效应组分-天麻效应组分, 经研究表明效应组分与原方相比, 保留了其治疗偏头痛的良好药效, 而且具有给药剂量更小、物质基础更明确等优点。药效学研究表明, 大川芎方效应组分对冰乙酸引起的扭体反应有明显的

表 3 各组大鼠尿液中的差异代谢物

Table 3 Identification of differential metabolites in urine

组别	保留时间 /min	m/z	离子模式	生物标志物	分子式	FC 值 模型组 /正常组	FC 值 DCXF 高剂量组 /正常组	FC 值 DCXF 高剂量组 /模型组
Urine positive ion	5.15	205.081 2	[M + H] ⁺	色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.29	0.64	0.28
	0.71	182.074 7	[M + H] ⁺	酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	1.52	2.14	1.41
	0.62	104.104 7	[M + H] ⁺	γ-氨基丁酸	C ₄ H ₉ NO ₂	0.65	1.16	1.78
	0.66	90.025 5	[M + H] ⁺	乳酸	C ₃ H ₆ O ₃	0.70	1.50	2.14
	5.54	118.087 6	[M + H] ⁺	缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.45	0.36	0.25
	0.55	105.043 5	[M + H] ⁺	β-羟丁酸	C ₄ H ₈ O ₃	0.42	0.82	1.97
	8.56	119.085 3	[M + H] ⁺	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	0.80	0.83	1.03
Urine Negative ion	0.64	208.089 0	[M - H] ⁻	犬尿氨酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	1.05	0.82	0.78
	1.38	189.045 9	[M - H] ⁻	犬尿喹啉酸	C ₁₀ H ₇ NO ₃	2.20	2.16	0.98
	12.00	146.062 1	[M - H] ⁻	谷氨酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	0.47	0.92	1.93



a. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; b. 色氨酸代谢; c. 丙酸代谢; d. 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成; e. 氮代谢; f. 氨酰基-tRNA 生物合成

图 4 DCXF 组潜在的 Pathway Impact 分析

Fig. 4 Pathway Impact analysis of DCXF group

抑制作用,即可发挥镇痛作用;建立硝酸甘油致急性偏头痛大鼠模型,以血浆中的 5-HT 含量为指标,大川芎方效应组分可以显著提高模型组 5-HT 的含量,表明其对头痛发作期颅外扩张的血管起收缩作用,从而缓解头痛症状,且效应组分间具有较好的协同作用。在此基础上,使用前期研究制备了源自大川芎方的抗偏头痛效应组分,采用调释技术,以挤出滚圆法制备了 DCXF。

本课题组前期的研究中^[13],已对 DCXF 进行了释药性评价,发现洋川芎内酯 I,阿魏酸,洋川芎内

表 4 DCXF 可能的代谢通路

Table 4 Possible pathway for DCXF

可能的代谢通路	P
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	9.99 × 10 ⁻⁵
氨酰基-tRNA 生物合成	1.585 3 × 10 ⁻⁴
丙酸代谢	3.154 2 × 10 ⁻⁴
氮代谢	4.365 7 × 10 ⁻⁴
色氨酸代谢	3.458 2 × 10 ⁻³
苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸生物合成	5.160 2 × 10 ⁻³

酯 H,天麻苷元可作为区分制剂质量的指标成分。本研究在前期研究基础之上,以镇痛物质基础明确的 DCXF 为研究对象,进行 DCXF 干预偏头痛相关的尿液代谢组学研究,来反映大川芎方可能干预偏头痛的作用机制。

对于一种药物干预疾病的代谢组学研究来说,尿液代谢组学作为一种终端代谢产物的组学,具有取样方便、无创伤性等特点,因此在临床及实验中得到广泛研究和认可^[14-15]。尿液代谢组学结果显示,硝酸甘油所致的大鼠急性偏头痛模型与正常组的大鼠有差异性代谢物主要有色氨酸,酪氨酸,缬氨酸,谷氨酰胺, GABA, 乳酸,β-羟丁酸,琥珀酸,犬尿氨酸,犬尿喹啉酸,主要为氨基酸代谢。相关的代谢通路为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、丙酸代谢、氮代谢、色氨酸代谢等。其中,犬尿氨酸是色氨酸代谢通路的产物,犬尿氨酸代谢通路亦是色氨酸代谢的主要通路之一,脑内 95% 的色氨酸通过此通路进行代谢^[16]。色氨酸通过色氨酸-2,3 加双氧酶和吲哚

胺-2,3 加双氧酶催化生成犬尿氨酸,犬尿氨酸通过犬尿氨酸转移酶生成犬尿喹啉酸,造模后尿液中色氨酸、犬尿氨酸、犬尿喹啉酸上升,说明硝酸甘油引起的急性偏头痛模型激活了色氨酸代谢通路,使大多数色氨酸聚集脑中,最后从脑中代谢到尿液中排除体外。犬尿喹啉酸为广谱的内源性兴奋性氨基酸受体拮抗剂,其可通过抑制 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA,离子型兴奋性氨基酸受体,配体为甘氨酸和谷氨酸)受体活性,从而影响兴奋性氨基酸活性,主要表现为尿液中谷氨酰胺含量下降。在给予大川芎方多组分制剂后,其体内的色氨酸、缬氨酸等发生显著下调,GABA,乳酸, β -羟丁酸等呈现上调趋势;且色氨酸,GABA,乳酸, β -羟丁酸,琥珀酸,犬尿氨酸,犬尿喹啉酸等代谢水平,逐渐接近正常状态。

有研究报道关于川芎中的酚酸类成分(阿魏酸为主)的代谢组学研究中,认为川芎酚酸组分可通过改善血管舒缩、减少炎症介质释放等多种途径产生活血化瘀功效缓解并治疗偏头痛疾病^[17];天麻中的主要有效成分天麻素、天麻苷元等,天麻苷元其脂溶性强,通过血脑屏障,增强 GABA 受体亲和力^[18];天麻素则可抑制谷氨酸递质介导的兴奋性毒性和激活 GABA 受体活性的表达来,两者联合可以维持脑内氨基酸神经递质的平衡^[19]。

综上所述,DCXF 干预偏头痛可能是主要通过干预氨酸代谢通路所致,其中主要包括色氨酸通路,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等其他通路也有参与其中。

[参考文献]

[1] Pradhan A, Mcguire B, Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine [J]. PAIN, 2014, 155 (2): 269-274.

[2] Lipton R B, Bigal M E, Diamond M, et al. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy [J]. Neurology, 2007, 68(5): 343-349.

[3] 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.

[4] LEI Y, LI D, DENG J, et al. Metabolomic profiling of three brain regions from a postnatal infected Borna disease virus Hu-H1 rat model [J]. Metabonomics, 2014, 10(3): 10484-10495.

[5] MA S Y, SHEN L, CHEN M W, et al. The study of

metabonomics combined with diversity of intestinal flora in LDP intervention in kidney-Yin deficiency hyperthyroid rats [J]. RSC Adv, 2015, 5 (71): 57975-57983.

[6] 陈勤. 少阳经穴针刺治疗偏头痛的代谢组学研究[D]. 四川: 成都中医药大学, 2009.

[7] 高骏. 针刺治疗偏头痛经穴效应特异性的¹HNMR代谢组学基础研究[D]. 四川: 成都中医药大学, 2011.

[8] 周本宏, 周静, 吴丽宁, 等. 天麻-川芎对偏头痛模型大鼠尿液内源性物质代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 104-108.

[9] 李慧, 吴艳华, 陈宝田, 等. 正天丸对偏头痛大鼠的血浆代谢组学研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(9): 1046-1049.

[10] WANG Q, SHEN L, MA S Y, et al. Effects of ligusticum Chuanxiong and gastrodia elata on blood-brain barrier permeability in migraine rats [J]. Pharmazie, 2015, 70(6): 421-426.

[11] HONG Y L, FENG Y, XU D S, et al. Study on extraction and purification of active parts from Da ChuanXiong Fang for treatment of migraine [J]. J Chin Med Mater, 2007, 10(6): 721-723.

[12] 王强. 基于体内过程的大川芎方中风药川芎“引药上行”的配伍原理研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2014.

[13] 马诗瑜, 沈岚, 王清清, 等. 大川芎方多组分制剂释药特性的评价[J]. 中成药, 2017, 39(5): 939-945.

[14] 王高玉, 刘红宁, 戈淑超, 等. 铁皮石斛水提物对胃癌前病变作用的尿液代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 77-85.

[15] 杨瑞, 唐思, 董晓茜, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析雷公藤配伍甘草治疗肾病综合征大鼠的尿液代谢组学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 150-156.

[16] 王晓丹. D-犬尿氨酸中枢神经系统的代谢及神经化学作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.

[17] 何磊, 包永睿, 孟宪生, 等. 基于活血化瘀功效的川芎酚酸组分治疗大鼠偏头痛作用机制研究[J]. 中南药学, 2018, 16(1): 45-49.

[18] 于雪, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 天麻的活性成分及功能性研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 392-395, 399.

[19] 田慧, 张丹参. 天麻素神经保护机制的研究进展[J]. 神经药理学报, 2013, 3(5): 58-64.

[责任编辑 周冰冰]