

基于代谢通路调控的沙棘籽油抗抑郁作用机制研究

赵思俊^{1,2}, 赵晓喆², 向 欢³, 秦雪梅^{2*}, 田俊生^{2*}

1. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

2. 山西大学 中医现代研究中心, 山西 太原 030006

3. 山西大学体育学院, 山西 太原 030006

摘要:目的 采用 ¹H-NMR 代谢组学技术结合 KEGG 数据库, 分析沙棘籽油干预慢性温和不可预知应激 (CUMS) 抑郁大鼠血清和尿液中代谢物及其代谢通路的变化, 探讨沙棘籽油抗抑郁的作用机制。方法 复制 CUMS 模型, 同步给予沙棘籽油干预, 连续 4 周。采集大鼠血清和尿液进行 ¹H-NMR 检测, 利用代谢组学技术分析血清和尿液中代谢物的变化, 搜索 KEGG 数据库分析代谢通路。结果 在血清和尿液中共寻找出 17 个与抑郁症相关的潜在生物标志物, 其中血清中有 9 个, 包括与对照组比较升高的脂质、β-羟基丁酸、乳酸、N-乙酰糖蛋白和降低的丙氨酸、甜菜碱、氧化三甲胺、α-葡萄糖、β-葡萄糖; 尿液中有 8 个, 包括与对照组比较升高的琥珀酸酯、天冬氨酸盐和降低的醋酸、2-酮戊二酸、柠檬酸、三甲胺、甜菜碱、苯丙氨酸。沙棘籽油干预后上述差异代谢物均出现了不同程度的回调, 接近对照组水平。结论 沙棘籽油主要是通过调节体内的能量代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、甲胺代谢和神经递质的合成等代谢通路发挥抗抑郁作用。

关键词: 沙棘籽油; 抑郁症; 代谢组学; 代谢通路调控; 慢性温和不可预知应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)13-2682-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.015

Regulation of seabuckthorn seed oil on metabolic pathway disturbances on rats exposed to chronic unpredictable mild stress

ZHAO Si-jun^{1,2}, ZHAO Xiao-zhe², XIANG Huan³, QIN Xue-mei², TIAN Jun-sheng²

1. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

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

3. Physical Education Department of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To analyze and explore the changes of the metabolites in serum and urine of the chronic unpredictable depression rat model (CUMS) rats disturbed by seabuckthorn seed oil with using nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) and KEGG database. **Methods** CUMS was prepared and the rats seabuckthorn seed oil was given to intervene at the same time for four weeks. Then the serum and the urine of rats were collected to test by ¹H-NMR based metabolomics approach which purpose was to analyze the changes of the metabolites. Finally, the KEGG database was searched to analyze metabolic pathway. **Results** A total of 17 metabolites were identified as potential biomarkers in serum and urine for the CUMS model, of which nine metabolites were found in serum including higher levels of lipids, β-OH-butyrate, lactate, and N-acetyl glycoprotein and lower levels of alanine, betaine, trimethylamine N-oxide, α-glucose, and β-glucose and eight metabolites were found in urine including level increments for succinate, aspartate and level reductions for acetate, 2-oxoglutaric acid, citrate, TMA, betaine, and phenylalanine, compared with the negative control group (NS). After intervened by seabuckthorn seed oil, the above different metabolites have appeared different degree of callback, closing to NS. **Conclusion** These metabolic responses to CUMS treatment by seabuckthorn seed oil seemed to be some alterations in energy metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, methylamine metabolism, and synthesis of neurotransmitter.

Key words: seabuckthorn seed oil; depression; metabolomics; regulation of metabolic pathways; chronic unpredictable mild stress

收稿日期: 2017-02-13

基金项目: 山西省科技计划项目 (201603D321077, 201603D3113013)

作者简介: 赵思俊 (1982—), 男, 山西人, 在读博士研究生, 主管药师, 研究方向为中药药理与毒理。

Tel: (0351)2021925 E-mail: zsj4429731@163.com

*通信作者 秦雪梅, 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量标准及代谢组学研究。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

田俊生, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理与新药研发。Tel: (0351)7019297 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

抑郁症是一种常见的情感性心境障碍,临床主要表现为显著且持久的情绪低落、精力缺乏和快感丧失等症状,以发病率高、复发率高和致残率高为特点^[1]。抗抑郁药物已被临床广泛使用,但其不良反应众多^[2]。因此,开发新的具有抗抑郁功能的药品和食品已成为研究焦点。从资源丰富的中药中寻找复方或者活性成分成为目前研究的热点^[3-4]。

沙棘 *Hippophae rhamnoides* Linn. 是胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 *Hippophae* L. 植物。沙棘籽油含有生物碱、黄酮、甾醇、三萜烯类及各种维生素等 140 多种生物活性成分^[5], 其中主要成分为多不饱和脂肪酸 (PUFA), 早在几世纪前的亚洲和欧洲就被广泛使用^[6-7]。沙棘籽油中的 PUFA 主要是 ω -3 系列的多不饱和脂肪酸 (EPA), 如 α -亚麻酸 (ALA) 和亚油酸 (LA)。有文献报道^[8]ALA 已被建议用于预防抑郁症的发生, 而 EPA 被认为有助于缓解抑郁情绪, 因此, 沙棘籽油作为一种功能食品和膳食营养补充剂越来越受到人们关注, 但关于其发挥抗抑郁作用的机制研究较少。

代谢组学是利用核磁共振谱 (NMR) 或质谱 (MS) 技术采集数据, 分析体液 (血清或尿液) 或组织中的代谢物, 采用多元统计分析寻找差异代谢物, 推测疾病或药物干预的潜在生物标志物^[9-10]。代谢组学技术已应用在疾病早期诊断、药物作用机制研究和食品安全评价等众多领域^[11-12]。

本课题组前期对沙棘籽油的抗抑郁作用药效进行了初步评价, 证明了沙棘籽油能明显减少小鼠悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间, 对慢性温和不可预知应激 (CUMS) 模型大鼠体质量、糖水偏爱、行为活动等指标均有不同程度的改善作用^[13-14], 但尚未对其作用机制进行研究。本研究采用 ¹H-NMR 代谢组学技术, 检测血清和尿液中的代谢产物, 并利用 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库, 分析沙棘籽油干预抑郁症相关的代谢过程, 探讨沙棘籽油抗抑郁的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂、试药及动物

沙棘籽油 (含亚油酸 0.362 g/g、亚麻酸 0.289 g/g, 批号 20120812) 购于内蒙古宇航人高技术产业有限责任公司, 采用大豆色拉油稀释至所需浓度; 盐酸文拉法辛胶囊 (成都大西南制药股份有限公司, 批号 090705), 采用生理盐水稀释至所需浓度。重水 (D₂O, 质量分数 99.9%, 美国默克试剂

公司), 三乙基甲硅烷基丙酸钠 (TSP, 质量分数 98%, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA), 所有化学试剂均为分析纯。健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量 180 ~ 220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2011-0012, 适应 1 周后开始实验, 室温保持在 (22 ± 1) °C, 12 h/12 h 节律照明, 自由摄食饮水。

1.2 CUMS 模型复制、分组及给药

60 只大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 即对照组, 模型组, 文拉法辛 (50 mg/kg) 组, 沙棘籽油高、中、低剂量 (1.40、0.70、0.35 g/kg) 组, 各组大鼠均 ig 给予相应的药物 1 mL/kg, 连续给药 4 周, 对照组和模型组 ig 给予等体积的大豆色拉油。CUMS 刺激包括 4 冰水游泳 5 min、禁食 24 h、禁水 24 h、45 热应激 5 min、夹尾 2 min、足底电击 5 min、束缚、超声刺激 3 h。除对照组外, 其余各组大鼠单笼饲养, 随机实施以上刺激, 每日 1 次, 连续 4 周。CUMS 刺激造模的同时给药。

1.3 体质量及糖水偏爱率测定

分别于实验第 0、1、2、3、4 周测定大鼠体质量, 并进行糖水消耗实验。糖水消耗实验于禁水 24 h 后进行, 并计算糖水偏爱率。

糖水偏爱率 = 糖水消耗量 / 总液体消耗量

1.4 旷场行为实验

分别于实验第 0、4 周进行旷场实验。将大鼠放入自制旷场实验箱的中心位置, 适应 2 min 后, 记录 4 min 内大鼠穿越格数和直立次数。

1.5 血清和尿液的收集

实验结束后, 大鼠禁食 12 h, 代谢笼收集 12 h 尿液, 尿液收集时将采集管置于冰盒中低温保温, 并加入了叠氮钠 (1 mmol/L, 500 μ L) 作为抑菌剂。大鼠 ip 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉后, 股动脉取血, 血液和尿液 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 -80 °C 保存。

1.6 血清和尿液的预处理

精密吸取 450 μ L 解冻后的血清置于 EP 管中, 加入 350 μ L D₂O 涡旋混匀, 13 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 取上清液 600 μ L 置于 5 mm 的核磁管中, 待测。精密吸取 500 μ L 解冻后的尿液置于 EP 管中, 加入 200 μ L D₂O 配制的磷酸缓冲液 [0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.2 mol/L NaH₂PO₄ (81 : 19), pH 7.40, 含 0.03% 的 TSP], 涡旋混匀, 13 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 取上清液 600 μ L 置于 5 mm 的核磁管

中, 待测。

1.7 ^1H -NMR 图谱测定条件

在 Bruker 600-MHz AVANCE III NMR 谱仪 (Bruker Biospin, Rheinstetten, 德国) 上采集数据, 血清样本采用 CPMG 脉冲序列, 尿液样本采用 NOESY 脉冲序列, 检测温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 混合时间 0.15 s, 延迟时间 2 s, 自旋弛豫延迟为 320 ms, 自由感应衰减 64 k, 谱宽 8 kHz, 扫描 64 次。

1.8 ^1H -NMR 图谱处理

采用 MestReNova 核磁图谱处理软件对所有 ^1H -NMR 图谱进行相位、基线校正和谱峰对齐处理。CPMG 图中以 β -葡萄糖 (δ 5.24), NOESY 图中以 TSP (δ 0.00) 为标准对谱图进行化学位移校正, 去除 NOESY 图中 δ 4.70~5.02 和 δ 5.50~6.20, 以消除水峰和尿素峰对数据的影响。以 δ 0.02 为单位, 对余下的 δ 0.50~9.50 的谱图进行分段积分, 将所得的数据进行归一化处理, 采用 SIMCA-P 13.0 软件进行多元统计分析。

2 结果与分析

2.1 对 CUMS 大鼠体质量及糖水偏爱率的影响^[13]

各实验组大鼠体质量随着实验进程的推进, 均有不同程度的增加, 其中对照组增加明显, 模型组增加缓慢, 各给药组与模型组比较差异均显著, 提示沙棘籽油能够明显增加抑郁模型大鼠的体质量, 改善抑郁状态。

对照组大鼠糖水偏爱率随着实验进程的推进总体趋势平稳, 模型组大鼠糖水偏爱率逐渐降低,

对照组、文拉法辛组和沙棘籽油各剂量组在实验第 14 天时降低到低谷, 随后逐渐回升, 且在实验 4 周时, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$), 表明沙棘籽油各剂量组在改善 CUMS 抑郁症大鼠兴趣缺失方面效果显著。

2.2 对 CUMS 大鼠旷场行为的影响^[13]

实验结果显示, 经过 CUMS 刺激后, 模型组大鼠穿越格数和直立次数明显减少, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。各给药组大鼠穿越格数和直立次数与模型组比较均显著增加 ($P < 0.01$), 表明沙棘籽油各剂量组均能明显增加 CUMS 抑郁症大鼠的行为活动能力。

2.3 ^1H -NMR 图谱的指认与分析

对照组大鼠血清和尿液的 ^1H -NMR 图谱见图 1。参考文献结合 Chenomx NMR Suite 7.0 软件和 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库以及本实验室相关 2D NMR 图谱, 对本实验所得 ^1H -NMR 图谱进行化合物指认, 其化学位移和谱峰归属见表 1。

2.4 CUMS 模型大鼠血清和尿液 ^1H -NMR 图谱多元统计分析

CUMS 模型大鼠血清和尿液正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 分析结果见图 2, 由图 2-A、C 可知, 对照组和模型组样本沿 $t[1]$ 轴分开, 表明 CUMS 模型复制成功。通过建立 OPLS-DA 模型相应的 S-plots 图 (图 2-B、D), 结合 VIP 值 ($\text{VIP} > 1$) 进行筛选, 对筛选的代谢物峰面积经独立样本 t 检验, 寻找潜在生物标志物。在血清中得到 9 个具

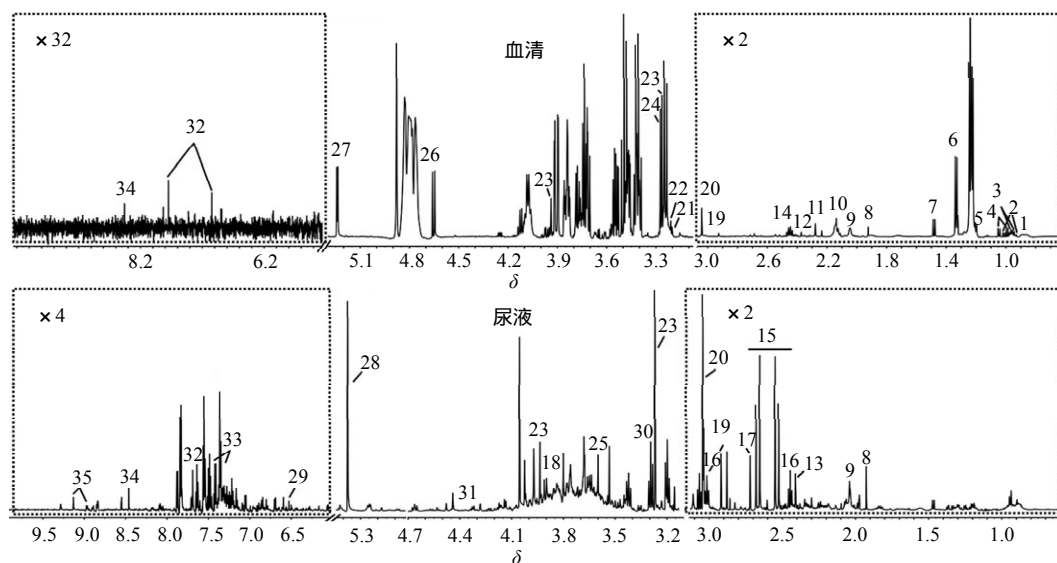


图 1 对照组大鼠血清和尿液的 ^1H -NMR 谱

Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectrum of rat serum and urine from control group

表 1 大鼠血清和尿液中指认的代谢物
Table 1 $^1\text{H-NMR}$ data and assignments of metabolites in rat serum and urine

编号	代谢物	基团	化学位移	样本
1	脂质	$\text{CH}_3, (\text{CH}_2)_n, \text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$	0.87 (m), 1.27 (m), 2.0 (m)	血清
2	异亮氨酸	$\delta\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_2, \beta\text{CH}, \alpha\text{CH}$	0.93 (t, $J=7.2$ Hz), 1.00 (d, $J=7.2$ Hz), 1.46 (m), 1.97 (m), 3.56 (dd, $J=2.4, 4.2$ Hz)	血清
3	亮氨酸	$\delta\text{CH}_3, \delta'\text{CH}_3, \gamma\text{CH}, \alpha\text{CH}_2$	0.94 (d, $J=6.6$ Hz), 0.96 (dt, $J=6.6$ Hz), 1.71 (m), 3.74 (m)	血清
4	缬氨酸	$\gamma\text{CH}_3, \gamma'\text{CH}_3, \beta\text{CH}, \alpha\text{CH}$	0.99 (d, $J=7.2$ Hz), 1.04 (d, $J=7.2$ Hz), 2.27 (m), 3.61 (d)	血清
5	β -羟基丁酸	$\gamma\text{CH}_3, \beta\text{CH}, \alpha\text{CH}_2$	1.2 (d, $J=6.6$ Hz), 4.23 (m), 2.31 (dd, $J=6.0, 13.8$ Hz), 2.38 (dd, $J=7.2, 13.8$ Hz)	血清
6	乳酸	$\beta\text{CH}_3, \alpha\text{CH}$	1.33 (d, $J=6.6$ Hz), 4.11 (q, $J=7.2$ Hz)	血清
7	丙氨酸	$\beta\text{CH}_3, \alpha\text{CH}$	1.48 (d, $J=7.2$ Hz), 3.78 (q, $J=7.2$ Hz)	血清
8	醋酸	CH_3	1.91 (s)	血清、尿液
9	<i>N</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.04 (s)	血清、尿液
10	<i>O</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.14 (s)	血清
11	乙酰乙酸盐	CH_3	2.27 (s)	血清
12	丙酮酸	βCH_3	2.37 (s)	血清
13	琥珀酸	CH_2	2.41 (s)	尿液
14	谷氨酸	$\beta\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	2.14 (m), 2.45 (dd, $J=3.6, 7.8$ Hz), 3.77 (dd, $J=5.4, 7.2$ Hz)	血清
15	柠檬酸	CH_2, CH_2	2.53 (d, $J=15.0$ Hz), 2.67 (d, $J=15.0$ Hz)	尿液
16	2-酮戊二酸	$\beta\text{CH}_2, \gamma\text{CH}_2$	2.45 (t, $J=7.2$ Hz), 3.02 (t, $J=7.2$ Hz)	尿液
17	二甲胺	CH_3	2.73 (s)	尿液
18	天冬氨酸	$\beta\text{CH}_2, \beta\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	2.67 (dd, $J=8.4, 16.8$ Hz), 2.82 (dd, $J=4.2, 17.4$ Hz), 3.88 (dd, $J=4.2, 8.4$ Hz)	尿液
19	三甲胺	CH_3	2.93 (s)	血清、尿液
20	肌酸	CH_3, CH_2	3.04 (s), 3.93 (s)	血清、尿液
21	胆碱	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.20 (s)	血清
22	胆碱磷酸	CH_3	3.21 (s)	血清
23	甜菜碱	CH_3, CH_2	3.26 (s), 3.94 (s)	血清、尿液
24	氧化三甲胺	CH_3	3.27 (s)	血清
25	甘氨酸	CH_2	3.57 (s)	尿液
26	α -葡萄糖	1-CH	4.65 (d, $J=7.8$ Hz)	血清
27	β -葡萄糖	1-CH	5.24 (d, $J=7.8$ Hz)	血清
28	尿囊酸	CH	5.38 (s)	尿液
29	延胡索酸酯	CH	6.53 (s)	尿液
30	氨基乙磺酸	<i>S</i> - $\text{CH}_2, \text{N-CH}_2$	3.26 (t), 3.29 (t)	尿液
31	苹果酸	CH	4.32 (dd, $J=3.0, 10.2$ Hz)	尿液
32	组氨酸	H_4, H_2	7.05 (s), 7.75 (s)	血清、尿液
33	苯丙氨酸	H_2 & $\text{H}_6, \text{H}_4, \text{H}_3$ & H_5	7.31 (m), 7.37 (m), 7.42 (m)	尿液
34	甲酸	H-COOH	8.45 (s)	血清、尿液
35	还原型辅酶I	H_3, H_2	8.84 (d, $J=7.8$ Hz), 9.13 (d, $J=6.6$ Hz)	尿液

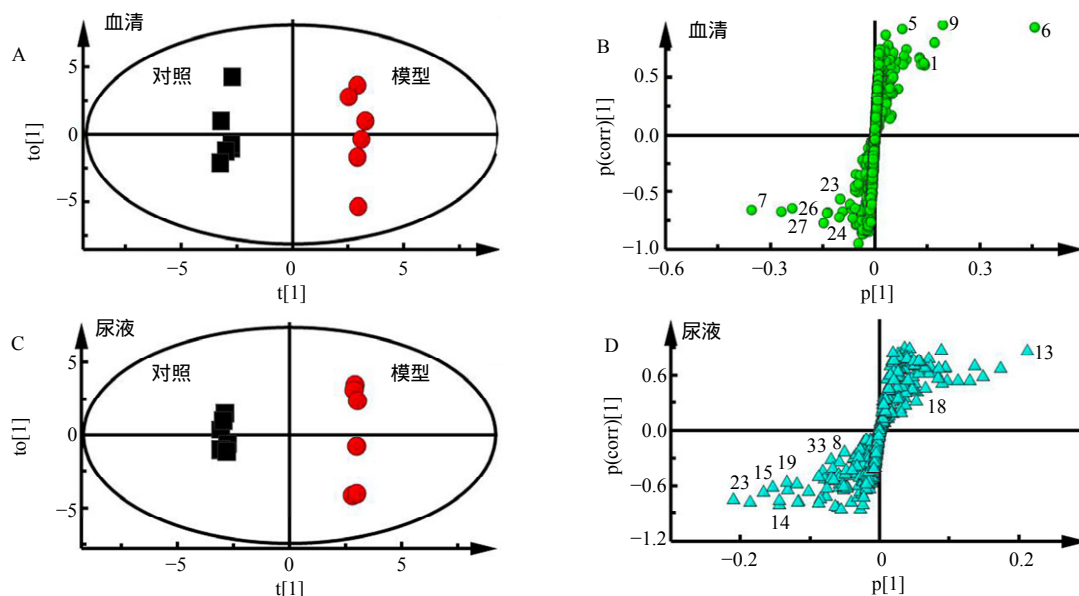


图 2 对照组和模型组大鼠血清、尿液 $^1\text{H-NMR}$ 谱 OPLS-DA 散点图 (A, C) 及载荷图 (B, D) 分析

Fig. 2 OPLS-DA scores plot (A, C) based on $^1\text{H-NMR}$ spectra of serum and urine obtained from rats in control group and model group and S-plots (B, D) corresponding to OPLS-DA

有显著性差异 ($P < 0.05$) 的潜在生物标志物, 包括与对照组比较升高的脂质、 β -羟基丁酸、乳酸、 N -乙酰糖蛋白和降低的丙氨酸、甜菜碱、氧化三甲胺、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖; 在尿液中得到 8 个具有显著性差异 ($P < 0.05$) 的潜在生物标志物, 包括与对照组比较升高的琥珀酸酯、天冬氨酸盐和降低的醋酸、2-酮戊二酸、柠檬酸、三甲胺、甜菜碱、苯丙氨酸。这些代谢物的变化参与了体内的脂质代谢、能量代谢、甲胺代谢和神经递质的合成等。经 OPLS-DA 的模型排列可知, 实验中左端任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 值均小于右端的原始值, 表明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 y 变量的预测能力, 即模型有效, 可进行后续的分析。所得验证图见图 3。对照组和模型组血清及尿液中差异代谢物见表 2。

2.5 沙棘籽油各组大鼠血清和尿液 $^1\text{H-NMR}$ 图谱的多元统计分析

各给药组血清和尿液的偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 结果见图 4。由图 4 中血清结果可知, 模型组与对照组之间代谢差异显著, 文拉法辛和沙棘籽油高、中剂量组的代谢产物与对照组比较接近, 沙棘籽油高剂量回调与对照组基本重合。

采用 OPLS-DA 对各给药组与模型组的血清、尿液分别进行比较, 由图 5 和 6 可知, 各给药组与模型组样本均能沿 $t[1]$ 轴分开, S-plots 图显示相关的代谢物的变化, 表 2 列出了与模型组比较积分面积具有显著性差异的代谢物, 这些代谢物的变化参与了体内的氨基酸代谢、脂质代谢和糖酵解等代谢调控。

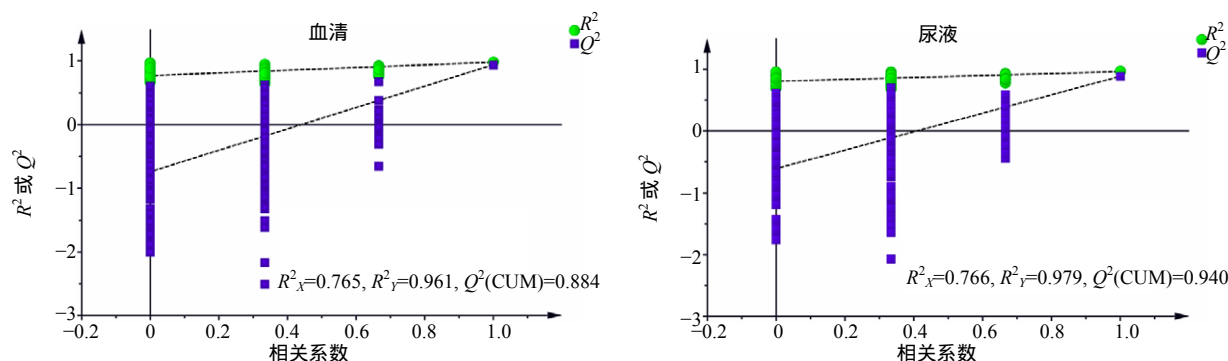


图 3 对照组和模型组大鼠血清、尿液模型有效验证图

Fig. 3 Effective verification of serum and urine obtained from rats in control group and model group

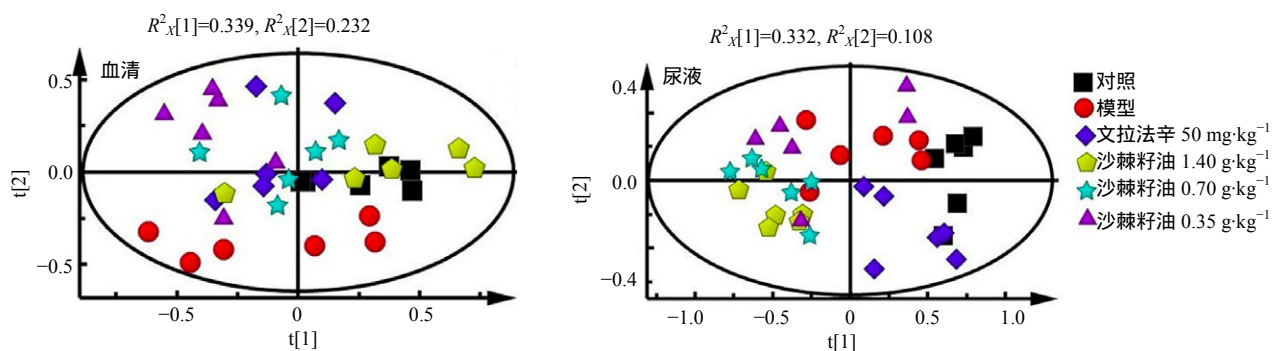
表 2 各组大鼠血清和尿液中潜在生物标志物及其变化趋势

Table 2 Potential biomarkers characterized in serum and urine profile and their change trends in different groups

代谢物	样本	VIP 值	模型组 vs 对照组	文拉法辛组 vs 模型组	沙棘籽油高剂 量组 vs 模型组	沙棘籽油中剂 量组 vs 模型组	沙棘籽油低剂 量组 vs 模型组	代谢途径
脂质	血清	1.27	↑*	↓*	↓*	↓	↓	脂质代谢
β-羟基丁酸	血清	1.58	↑*	↓*	↓*	↓	↓	脂质代谢
乳酸	血清	4.14	↑*	↓*	↓*	↓*	↓*	糖酵解
丙氨酸	血清	1.07	↓*	↑*	↑	↑	↑	氨基酸代谢
N-乙酰糖蛋白	血清	2.38	↑*	↓	↓*	↓	↓	炎症
甜菜碱	血清	1.69	↓*	↑*	↑*	↑*	↑	甲胺代谢
氧化三甲胺	血清	2.59	↓*	↑*	↑*	↑	↑	甲胺代谢
α-葡萄糖	血清	1.79	↓*	↑*	↑	↑*	↑*	糖酵解
β-葡萄糖	血清	1.36	↓*	↑	↑	↑	↑	糖酵解
醋酸	尿液	10.90	↓*	↑*	↑*	↑	↑	能量代谢
琥珀酸	尿液	2.97	↑*	↓*	↓*	↓*	↓	TCA 循环
2-酮戊二酸	尿液	2.70	↓*	↑*	↑*	↑	↑	TCA 循环
柠檬酸	尿液	3.94	↓*	↑*	↑*	↑*	↑*	TCA 循环
三甲胺	尿液	1.41	↓*	↑*	↑*	↑*	↑*	甲胺代谢
天冬氨酸	尿液	1.29	↑*	↓*	↓*	↓*	↓	氨基酸代谢
甜菜碱	尿液	2.77	↓*	↑*	↑*	↑	↑	甲胺代谢
苯丙氨酸	尿液	1.46	↓*	↑*	↑*	↑	↑	神经递质的合成

两组间比较：* $P < 0.05$ ；-下调，-上调

* $P < 0.05$ comparison between two groups; ↓-down-regulated, ↑-up-regulated

图 4 各组大鼠血清、尿液 ^1H -NMR 谱 PLS-DA 分析散点图Fig. 4 Scores plot from PLS-DA model classifying based on ^1H -NMR spectrum of serum and urine of rats in each group

3 讨论

本研究血清和尿液样本中所指认的代谢物(表1)受 CUMS 造模和沙棘籽油干预影响显著。根据抑郁症与沙棘籽油干预抑郁症的代谢物变化,提出了相应的代谢通路(图7)。

血清中的脂质经 β -氧化生成乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 进入三羧酸(TCA)循环在肝脏中合成酮体,

或经氧化供给人体所需的能量。肝脏中的脂肪酸经氧化产生 β -羟基丁酸, 运输到脑组织产生能量^[15]。本研究发现 CUMS 大鼠血清中 β -羟基丁酸的量显著增加, 沙棘籽油干预后能使之减少, 从而降低酮酸中毒的风险。

乙酰辅酶 A 经 β -游离脂肪酸和丙酮酸脱氢氧化进入 TCA 循环, TCA 循环从乙酰辅酶 A 转移二

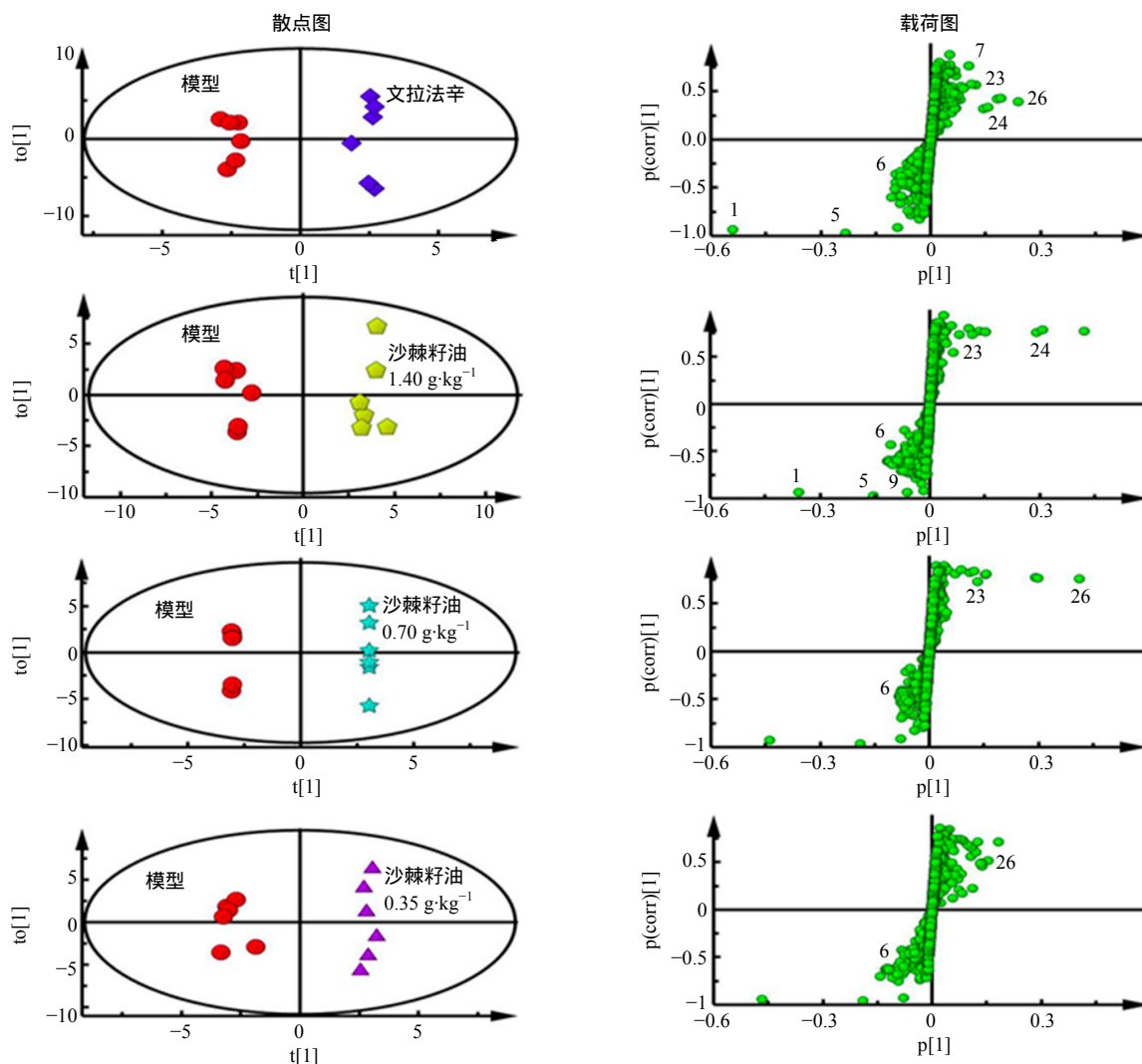


图 5 各给药组分别和模型组大鼠血清 ^1H -NMR 谱 OPLS-DA 散点图及载荷图比较分析

Fig. 5 OPLS-DA scores plot and S-plots based on ^1H -NMR spectra of serum obtained from rats in drug administration groups

碳乙酰基的草酰乙酸受体形成柠檬酸。慢性应激大鼠体液中具有显著性差异的代谢物柠檬酸、琥珀酸和 2-酮戊二酸均参与能量代谢。本研究发现 CUMS 大鼠的能量代谢紊乱, 而由乙酰辅酶 A 通过乙酰磷酸化产生的乙酸, 其水平的降低也揭示了能量代谢的紊乱^[16]。沙棘籽油干预后, 相应的能量代谢紊乱有所逆转。

甲胺类代谢物如甜菜碱和二甲基胺, 是由脂肪或含胆碱的食物分解成为单胺^[17-18]。甜菜碱为体内的生化反应提供和转运甲基。本研究发现 CUMS 大鼠尿液中三甲胺显著降低, 由于胆碱可代谢为三甲胺、二甲胺和甲胺从而破坏肠道微生物, 因此提示 CUMS 可能影响肠道菌群的功能。食欲减退是抑郁症患者的常见症状^[19]。肠道菌群的变化可能会影响

抑郁症患者的胃肠道功能, 也可能参与神经、免疫、内分泌及大脑和胃肠道之间的调节^[20]。本研究观察到甲胺类代谢物的下降, 可能与胆碱转化为甜菜碱和氧化三甲胺有关。

本研究发现与对照组比较, 模型组血清或尿液中的葡萄糖、乳酸、丙氨酸的变化具有显著性差异, 丙酮酸经丙酮酸脱氢酶生成乙酰辅酶 A, 也可转化为丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 或经乳酸脱氢酶 (LDH) 转化为乳酸。天冬氨酸转移酶 (AST) 从天冬氨酸盐转移氨基, ALT 从丙氨酸转移氨基, 与 α -酮戊二酸分别生成谷氨酸和丙酮酸。血清中的乳酸水平显著增加, 葡萄糖和丙氨酸显著下降, 表明在应激过程中糖酵解和氨基酸代谢受损。这些代谢物是能量合成的底物, 其变化可能会减少 ATP。

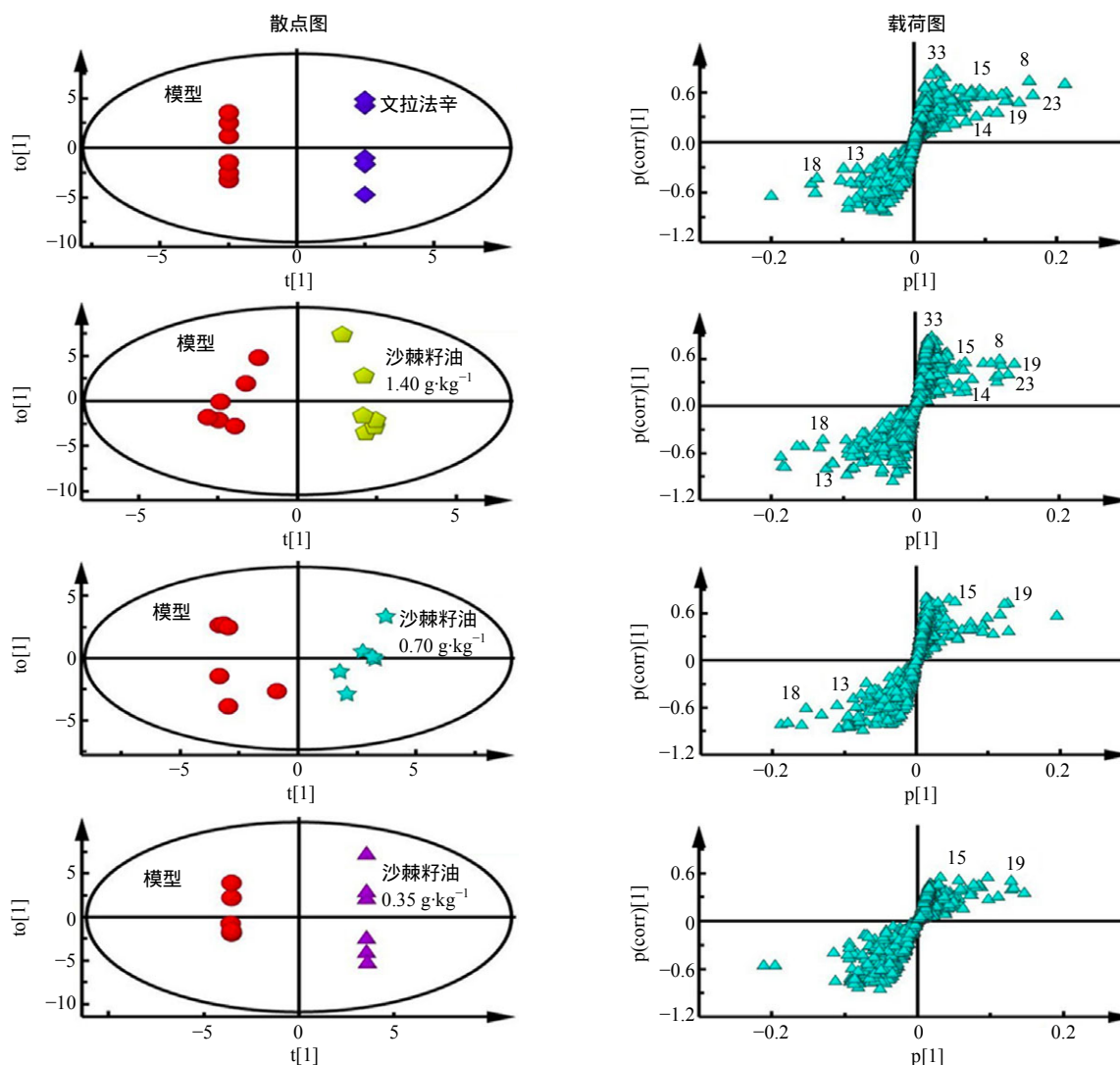
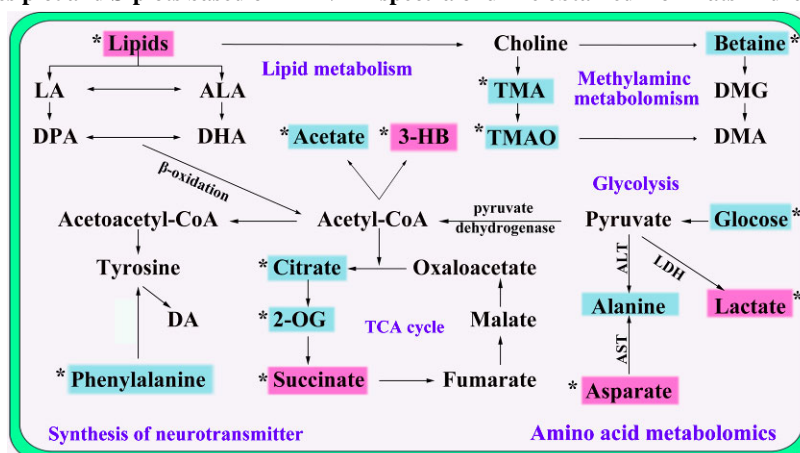


图 6 各给药组分别和模型组大鼠尿液 ^1H -NMR 谱 OPLS-DA 散点图及载荷图比较分析

Fig. 6 OPLS-DA scores plot and S-plots based on ^1H -NMR spectra of urine obtained from rats in drug administration groups



-对照组与模型组比较潜在生物标志物下调， -对照组与模型组比较潜在生物标志物上调，与对照组比较：* $P < 0.05$

-The levels of potential biomarkers were down-regulated in model group compared to the control group, -The levels of potential biomarkers were up-regulated in model group compared to the control group, * $P < 0.05$ vs control group

图 7 CUMS 模型影响的代谢通路变化

Fig. 7 Perturbed metabolic pathways in response to CUMS modeling

CUMS 模型大鼠尿液中门冬氨酸盐浓度的增加表明 AST 和 ALT 的反应受到抑制,沙棘籽油干预后可以调节糖酵解和氨基酸的代谢紊乱。苯丙氨酸是一种中性氨基酸,是酪氨酸的前体。苯丙氨酸的抗抑郁机制可能是合成苯丙氨酸的前体作用于神经递质多巴胺 (DA)^[21]。与模型大鼠比较,沙棘籽油干预后大鼠尿液中苯丙氨酸的量增加,提示沙棘籽油的抗抑郁作用可能与神经递质的合成有关。

综上所述,以 ¹H-NMR 代谢组学技术结合代谢通路调控分析在血清和尿液中筛选出 17 种 CUMS 模型中潜在的生物标志物,这些代谢物的变化参与了体内的能量代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、甲胺代谢和神经递质的合成等代谢通路,沙棘籽油通过调节这些代谢物发挥抗抑郁作用。

参考文献

- [1] 张 潇, 田俊生, 刘 欢, 等. 抗抑郁中药新药研发进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 21-25.
- [2] Nemeroff, C B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives [J]. *J Psychiatr Res*, 2007, 41(3/4): 189-206.
- [3] 宫文霞, 周玉枝, 李 肖, 等. 当归抗抑郁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3905-3911.
- [4] 李 肖, 宫文霞, 周玉枝, 等. 逍遥散中抗抑郁有效成分及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3109-3116.
- [5] 张 荣. ICP-MS 法测定沙棘籽油中 13 种微量元素 [J]. 国际沙棘研究与开发, 2014, 12(1): 10-13.
- [6] Heinäaho M, Hagerman A E, Julkunen-Tiitto R. Effect of different organic farming methods on the phenolic composition of sea buckthorn berries [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(5): 1940-1947.
- [7] Basu M, Prasad R, Jayamurthy P, *et al.* Anti-atherogenic effects of seabuckthorn seed oil [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(11): 770-777.
- [8] Nguemeni C, Delplanque B, Rovere C, *et al.* Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(3): 226-233.
- [9] 陈佳佳, 李爱平, 张晓琴, 等. 基于核磁共振代谢组学的成分数据分析在中药评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3522-3526.
- [10] Pekkinen J, Olli K, Huotari A, *et al.* Betaine supplementation causes increase in carnitine metabolites in the muscle and liver of mice fed a high-fat diet as studied by nontargeted LC-MS metabolomics approach [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(11): 1959-1968.
- [11] Zhao X J, Huang C, Lei H, *et al.* Dynamic metabolic response of mice to acute mequindox exposure [J]. *J Proteom Res*, 2011, 10(11): 5183-5190.
- [12] Chuang C Y, Shi Y C, You H P, *et al.* Antidepressant effect of GABA-rich *Monascus*-fermented product on forced swimming rat model [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(7): 3027-3034.
- [13] 田俊生, 郑晓芬, 张丽增, 等. 沙棘籽油抗抑郁作用 [J]. 食品科学, 2013, 34(19): 279-282.
- [14] Tian J S, Liu C C, Xiang H, *et al.* Investigation on the antidepressant effect of sea buckthorn seed oil through the GC-MS-based metabolomics approach coupled with multivariate analysis [J]. *Food Funct*, 2015, 6(11): 3585-3592.
- [15] Diao C F, Zhao L C, Guan M M, *et al.* Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a ¹H-NMR based metabonomic approach [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(3): 686-693.
- [16] Ni Y, Su M, Lin J, *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2627-2636.
- [17] Kraemer W, Bailey B, Clark J, *et al.* The influence of betaine supplementation on work performance and endocrine function in men [J]. *J Strength Cond Res*, 2011, 25: S100-S101.
- [18] De la Huerca J, Popper H. Urinary excretion of choline metabolites following choline administration in normals and patients with hepatobiliary diseases [J]. *J Clin Invest*, 1951, 30(5): 463-470.
- [19] O'Mahony S M, Marchesi J R, Scully P, *et al.* Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses [J]. *Biol psychiat*, 2009, 65(3): 263-267.
- [20] 郑 啸, 王广基, 郝海平. 抑郁症中的免疫代谢调控异常与药物干预研究进展 [J]. 药学学报, 2017, 52(1): 19-25.
- [21] Tian J S, Xia X T, Wu Y R, *et al.* Discovery, screening and evaluation of a plasma biomarker panel for subjects with psychological suboptimal health state using ¹H-NMR-based metabolomics profiles [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33820-33831.