

# 基于代谢组学技术的白金胶囊治疗抑郁症的研究

杨 培 李雪春 林龙飞 田晶辰 倪 健

(北京中医药大学中药学院, 北京, 100029)

**摘要** 目的:利用代谢组学技术探讨白金胶囊治疗抑郁症的机制。方法:以 SD 大鼠为研究对象,采用慢性不可预知应激制备抑郁大鼠模型。在进行脑代谢组学研究之前,采用体质量、糖水消耗量、旷场试验测定结果为指标评价建模效果和白金胶囊抗抑郁疗效。脑代谢组学研究采用液质联用技术结合 SPSS、SIMACA - P 软件分析测定结果,通过数据库(MASSBANK、METLIN、HMDB 和 KEGG)检索和文献分析,寻找出和抑郁相关的脑组织样本中的生物信息。结果:测得脑组织样本中共 1 194 种化合物。PCA 和 OPLS - DA 分析结果显示,得分矩阵中的空白组、模型组和药物组分别集中分布在 3 个不同区域,说明存在组间差异;结合载荷矩阵和 VIP 值进行搜库查询及文献分析,得到牛磺酸、苏糖酸、N - 乙酰天冬氨酸和肌苷 4 个主要化合物。结论:白金胶囊的抗抑郁药效与其改变脑内氨基酸水平、作用于中枢神经系统神经递质及参与能量代谢有关。

**关键词** 代谢组学;液质联用技术;抑郁

## Study on Anti-depression of Baijin Capsule based on Metabolomics

Yang Pei, Li Xuechun, Lin Longfei, Tian Jingchen, Ni Jian

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract Objective:** To explore the mechanism of Baijin capsule in the treatment of depression based on metabolomics. **Methods:** SD rats modeled by Chronic Unpredictable Mild Stress were made as experimental objects. The effect of modeling and antidepressant efficacy of Baijin capsule was appraised before the study of brain metabolomics with the results of determination including the body weight, sucrose consumption and open field trial. Additionally, the study attempted to find out the biological information related to depression in samples of brain tissue based on brain metabolomics research. Pharmacokinetics research was obtained by the combined result of LC-MS/MS and analytical software SPSS/SIMACA-P and retrieval of database (MASSBANK, METLIN, HMDB and KEGG) and literature analysis. **Results:** One thousand one hundred and ninety four compounds were determined by Metabolomics. The results of PCA and OPLS-DA indicated that the score matrix in normal group, CUMS group and drug group were distributed in three different areas which meant that there was a difference between groups. Four main indicators of compound taurine, threonic acid, N-acetyl aspartate and inosine were identified by integrating load matrix, library search and literature analysis. **Conclusion:** Baijin capsule is able to regulate the brain as an antidepressant by adjusting the levels of amino acids, effecting on central nervous system of neurotransmitter and energy metabolism.

**Key Words** Metabolomics; LC-MS/MS; Depression

中图分类号: R277.7 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.10.026

生物标志物包含着可能改善人类生存环境的信息。通过提供更早、更精确的诊断测试基础依据,生物标志物可以帮助临床医生发现和治疗疾病。同时,其作为终端替代物,还可以帮助研发出更好更多的目标药物来治疗疾病。寻找生物标志物遵循一定的联系统一性,从开始发现到巩固结束,经过证实的生物标志物可以广泛地使用在临床应用中。例如,心脏衰竭可以通过测量 B - natriuretic peptide 水平来进行精确诊断<sup>[1-2]</sup>,某些类型的癌症筛查和监测可以通过特定的肿瘤标志物实现<sup>[3-4]</sup>。对于抑郁症这样一种暂无实验室诊断指标的疾病来说,生物标志物的研究不仅有助于抑郁症的诊断和治疗,对于抗抑郁药物的研发具有

重要的意义。已有研究表明,重症抑郁患者外周系统中脂类和氨基酸类成分的浓度水平出现了异常的变化<sup>[5]</sup>。代谢组学的研究能够寻找出于抑郁疾病相关的生物标志物,其可能作为潜在的评价指标被应用于未来抗抑郁药物的研发。本研究采用慢性不可预知应激制备抑郁大鼠模型,以路优泰作为阳性对照药物,以糖水消耗量、行为学指标等评价模型建立成功与否及白金胶囊的抗抑郁药效。在此基础上,采用液质联用技术采集正常大鼠、抑郁大鼠和白金胶囊治疗大鼠脑组织样本中的信息,SPSS 和 SIMACA - P 软件相结合对其进行分析,以期寻找出和抑郁、白金胶囊相关的脑组织样本中生物信息,探讨白金胶囊治疗抑郁症的作用,

基金项目:科技重大专项课题 - 白金胶囊治疗精神性疾病 - 抑郁症的研究与开发(编号:2012ZX09103201 - 026)

通信作者:倪健,教授,现任北京中医药大学中药学院副院长,主要研究方向:药物新剂型、新技术及其体内过程, Tel: (010) 84738607, E - mail: njtcm@263.net

为白金胶囊的进一步研究提供参考。

1 资料和方法

1.1 一般资料 SD 大鼠雄性大鼠 40 只[清洁级, (250 ± 10)g], 许可证号:SCXK(京)2012 - 0001, 购自维通利华实验动物有限技术公司。实验前动物适应性饲养 1 周, 自由摄食饮水。1 周后根据体质量随机分为正常组和抑郁模型组, 正常组 10 只, 抑郁模型组 30 只。路优泰(圣·约翰草提取物, 批号: 2500711, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Germany), 白金胶囊(北京中医药大学倪健教授课题组自制, 批号: 201303), 乙腈和甲酸(色谱级, Fisher Scientific, NJ, USA), 超纯水(18.2 mΩ·cm)。Waters ACQUITY UPLC/Xevo G2 Q - TOF(Waters, USA)。

1.2 方法

1.2.1 抑郁大鼠的制备与分组 适应性饲养 1 周后, 采用慢性不可预知应激制备大鼠抑郁模型。除正常组外, 应激大鼠每天随机接受不同的刺激并在造模过程中保持孤养状态, 共 32 d。实验中采取的刺激方法见表 1。

表 1 慢性不可预知应激制备大鼠抑郁模型工作表

| 日期    | 刺激种类                                    |
|-------|-----------------------------------------|
| 第 1 天 | 夹尾 1 min                                |
| 第 2 天 | 24 h 禁水, 45 ℃ 请明确是游泳的水温还是环境温度强迫游泳 5 min |
| 第 3 天 | 24 h 禁食, 24 h 湿环境饲养                     |
| 第 4 天 | 更换垫料, 频闪照明 12 h                         |
| 第 5 天 | 饲养笼倾斜 45 度                              |
| 第 6 天 | 白噪音 2 h(85 dB)                          |
| 第 7 天 | 4 ℃ 请明确是游泳的水温还是环境温度强迫游泳 5 min           |
| 第 8 天 | 昼夜颠倒                                    |

注: 以上 8 d 为 1 个周期, 大鼠抑郁模型制备需经 4 个周期, 即 32 d。

造模结束后, 对大鼠进行体质量的测定, 糖水消耗量的测定以及旷场试验相关指标的测定。数据结果采用 SPSS 17.0 软件进行分析。将已经制备好的抑郁大鼠按照体质量随机分为 2 组, 即抑郁模型组、路优泰组、白金胶囊组。给药组采用灌胃给药的方式, 分别给予白金胶囊 0.389 5 g/d, 路优泰 0.018 g/d 连续 28 d。1) 糖水消耗实验: 禁水 12 h 后同时放入饮水水和 1% 蔗糖水, 2 h 后用量筒读取各只大鼠的饮水量及蔗糖水消耗量, 计算糖水消耗百分比。2) 旷场试验: 旷场试验在长、宽、高分别为 90 cm、90 cm 和 45 cm 的木制敞箱进行。每只动物测试 1 次, 5 min/次。每只大鼠测试完毕以后用 75% 乙醇擦拭箱内, 确保无排泄物和气味残留对试验结果产生影响。测试过程保持环境安静, 测试数据使用 Ethovision 软件进行分析。

1.2.2 样本的处理 给药结束后第 2 天同样测定体质量、糖水消耗量等指标, 测定完毕后次日处死大鼠, 迅速分离全脑, 称重后按重量体积比 1:1 加入冰甲醇溶液匀浆, -25 ℃ 冷冻备用。测定前样本常温解冻, 加入等体积乙腈 - 水(3:1)溶液提取, 涡旋 1 min, 离心取上清液, 待测。

1.2.3 质谱条件和液相条件 采用负离子检测模式的 ESI 电离方式, 质量扫描范围为 50 ~ 1 400 M/Z。毛细管电压: 2 500 V; 干燥气流体积流量: 700 L/H; 干燥气温度: 400 ℃。

色谱柱: Waters UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相: A(水 - 0.1% 甲酸) 和 B(乙腈 - 0.1% 甲酸); 柱温: 50 ℃; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 洗脱程序见表 2。

表 2 流动相梯度变化表

| 时间 (min) | 流动相 A(%) | 流动相 B(%) |
|----------|----------|----------|
| 0        | 80       | 20       |
| 17       | 0        | 100      |
| 18       | 0        | 100      |
| 18.1     | 80       | 20       |
| 21       | 80       | 20       |

2 结果

2.1 CUMS 模型筛选结果 造模结束后, 进行大鼠体质量、糖水消耗量和旷场实验的测定, 其相关测定指标结果见表 3。从表的结果可以看到, 模型组与正常大鼠比较, 体质量、糖水消耗量显著下降。模型组大鼠平均体重为 414 g, 空白组为 520 g; 模型组糖水消耗量从空白组的 34% 下降至 16%; 旷场试验测得的中央格穿刺次数从空白组的 5 次下降为 1 次, 平均运动速度和运动总距离降低约 50%, 说明采用慢性不可预知应激制备抑郁模型成功。路优泰治疗的抑郁大鼠, 体质量无明显变化, 但糖水消耗量、中央格穿刺次数和平均运动速度、距离均向着空白组的方向有明显恢复。经白金胶囊治疗的抑郁大鼠, 平均体质量回复至 484 g, 平均糖水消耗量增至 24%, 中央格穿刺次数增至 3 次, 平均运动速度和运动距离回复至空白组的 80% 左右。体质量和糖水消耗量的增长说明大鼠的食欲有所增加, 抑郁带来的兴趣丧失有所好转。综上所述, 白金胶囊能在一定程度上治疗慢性不可预知应激造成的抑郁症。在此基础上, 进一步对白金胶囊组、抑郁模型组和正常组大鼠大脑组织匀浆进行代谢组学的研究。

2.2 代谢组学图谱及数据解析 采用 MZmine 软件提取质谱峰并进行反卷积处理去噪音、缝隙填补处理等,

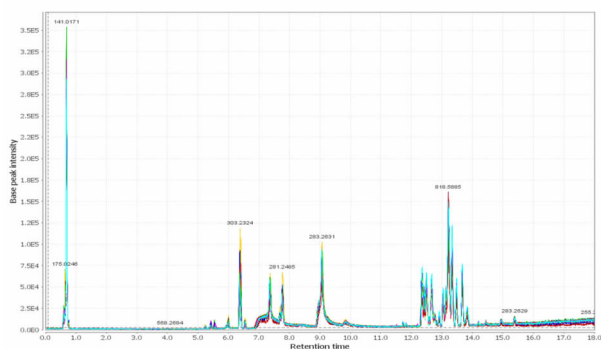
最终检测到 1 194 个离子,其总离子流图见图 1。在此基础上对代谢图谱进行数据解析,PCA 初步分析各组之间样本的总体分布情况、自然聚集情况和奇异样本的情况。最终得到的 2 个主要的部分:得分矩阵(白金胶囊组为红色点,抑郁模型组为绿色,正常组为黑色。右边是立体图。该空间中每一个点代表一个样本)和

载荷矩阵(该空间中每一点代表一个指标(ID: M/Z, RT)),如图 2 所示。其中得分矩阵可以看出 3 组间存在统计学意义,但相对于正常组和抑郁模型组而言,白金胶囊组的样本较分散,个体间差异明显,其中白金胶囊组一只大鼠在样本制备时出现操作失误,将此数据剔除后 E 组的有效样本量为 9。

表 3 抑郁指标测定结果(n=10)

| 组别    | 体质量(g)                | 糖水消耗量(%)            | 中央格穿刺次数        | 旷场试验                    |                        |
|-------|-----------------------|---------------------|----------------|-------------------------|------------------------|
|       |                       |                     |                | 平均运动速度(cm/s)            | 运动距离(cm)               |
| 正常组   | 522 ± 17              | 34 ± 5              | 5              | 12.50 ± 3.2             | 4696 ± 55              |
| 模型组   | 414 ± 19 <sup>Δ</sup> | 16 ± 3 <sup>Δ</sup> | 1 <sup>Δ</sup> | 6.77 ± 2.1 <sup>Δ</sup> | 2385 ± 84 <sup>Δ</sup> |
| 路优泰组  | 426 ± 27              | 22 ± 4 *            | 3 *            | 9.7 ± 3.2 *             | 3581 ± 77 *            |
| 白金胶囊组 | 484 ± 12 *            | 24 ± 4 *            | 3 *            | 10.2 ± 1.3 *            | 3656 ± 62 *            |

注:模型组与正常组相比,<sup>Δ</sup>P<0.05;药物治疗组与模型组相比,\*P<0.05。



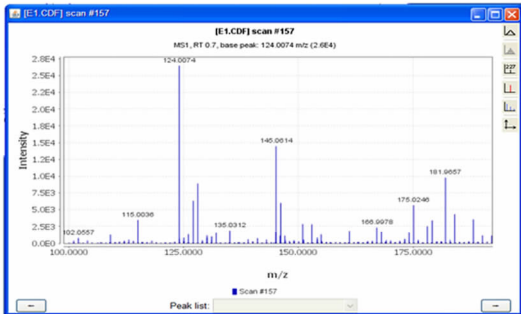
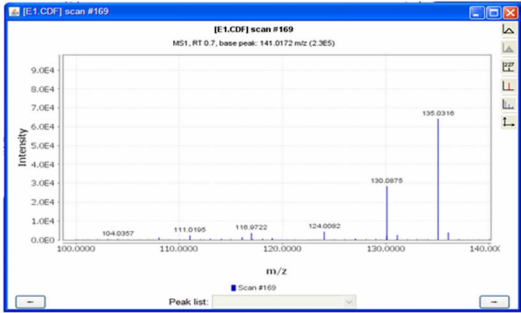
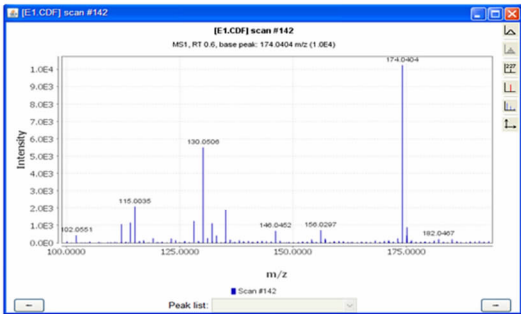
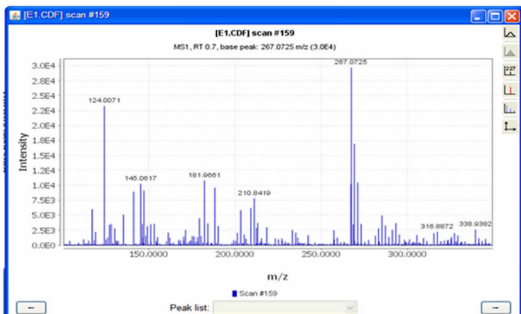
| 化合物                       | 质谱图                                                                                 | 分子信息                                                                                           |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Taurine</b>            |    | Formula: $C_2H_7NO_3S$<br>CAS: 107-35-7<br>[M-H] <sup>-</sup> m/z 124.0074<br>M 125.0147       |
| <b>Threonine</b>          |    | Formula: $C_4H_8O_5$<br>[M-H] <sup>-</sup> m/z 135.0299<br>M 136.0372                          |
| <b>N-acetyl aspartate</b> |  | Formula: $C_6H_9NO_5$<br>CAS: 997-55-7<br>[M-H] <sup>-</sup> m/z 174.0408<br>M 175.0481        |
| <b>Inosine</b>            |  | Formula: $C_{10}H_{12}N_4O_5$<br>CAS: 58-63-9<br>[M-H] <sup>-</sup> m/z 267.0735<br>M 268.0808 |

图3 四种化合物相关信息一览表

### 3 讨论

大鼠和小鼠作为行为神经学研究中最常用的动物模型,它们能够表现出与人类疾病相关的各种行为。在神经行为研究的初期,大鼠是最常用的模式生物<sup>[15]</sup>。已有研究成功将 CUMS 用于抑郁大鼠动物模型的制备,并认为是一种良好的疾病造模方法<sup>[16-17]</sup>。大鼠在许多标准的神经药理学任务中表现良好,而且它们的身体大小使我们更容易对其进行侵入性操作。无论是代谢组学研究还是抗抑郁药的药效研究中,采用慢性不可预知应激制备抑郁大鼠模型被普遍认可和接受<sup>[18-19]</sup>。

基于代谢组学的思想,通过分析内源性或外源性(药物产生)代谢物组的变化,我们可以分析生物体的状态,捕捉到和疾病相关的生物信号,推测生物体内代谢通路的变化,为疾病的诊断或治疗药物的研发提供指导。已有科研人员将研究重点放在抑郁动物模型的血浆或尿液样本的整体代谢物研究上,主要的分析测定方法包括气质联用色谱法、液质联用色谱法和磁共振成像<sup>[20-21]</sup>;还有一部分研究着眼于研究抗抑郁药物在血浆或尿液样本中的代谢情况<sup>[22-23]</sup>;作为一种重要的神经系统疾病,抑郁与大脑、中枢神经系统密切相关,因此研究选取大鼠的脑组织作为代谢组学的研究对象。本研究希望以白金胶囊作为中药复方抗抑郁药物的代表,从系统生物学的研究角度出发,结合代谢组学的研究技术,为抗抑郁中药的研究提供新的思路。

### 参考文献

- [1] Harutyunyan, M. The inflammatory biomarker YKL-40 as a new prognostic marker for all-cause mortality in patients with heart failure[J]. Immunobiology, 2012, 217(6): 652-656.
- [2] Saenz, A. J. Measurement of a plasma stroke biomarker panel and cardiac troponin T in marathon runners before and after the 2005 Boston marathon[J]. Am J Clin Pathol, 2006, 126(2): 185-189.
- [3] Buettner, R. and C. Heydt. Biomarker analysis from a pathologist's view. Founding the rationale for personalised treatment of lung cancer[J]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013, 56(11): 1502-1508.
- [4] Kondo, T. Inconvenient truth: Cancer biomarker development by using proteomics[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1844(5): 861-865.
- [5] Zheng, P. Peripheral metabolic abnormalities of lipids and amino acids implicated in increased risk of suicidal behavior in major depressive disorder[J]. Metabolomics, 2012, 9(3): 688-696.
- [6] Gonzalez-Quevedo, A. Amino acids as biochemical markers in epidemic and endemic optic neuropathies[J]. Rev Cubana Med Trop, 1998, 50(s): 241-244.
- [7] Sturman, J. A. Tissue taurine content, activity of taurine synthesis enzymes and conjugated bile acid composition of taurine-deprived and taurine-supplemented rhesus monkey infants at 6 and 12 mo of age[J]. J

- Nutr, 1991, 121(6): 854-862.
- [8] Gonzalez-Quevedo, A. Amino acid levels and ratios in serum and cerebrospinal fluid of patients with optic neuropathy in Cuba[J]. Nutr Neurosci, 2001, 4(1): 51-62.
- [9] Do, K. Q. Gamma-Glutamylglutamine and taurine concentrations are decreased in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with schizophrenic disorders[J]. J Neurochem, 1995, 65(6): 2652-2662.
- [10] Rothstein, J. D. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ann Neurol, 1990, 28(1): 18-25.
- [11] Tavazzi, B. Simultaneous high performance liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines, N-acetylated amino acids, and dicarboxylic acids for the chemical diagnosis of inborn errors of metabolism[J]. Clin Biochem, 2005, 38(11): 997-1008.
- [12] Harding, J. J. Sugars including erythronic and threonic acids in human aqueous humour[J]. Curr Eye Res, 1999, 19(2): 131-136.
- [13] Gunesal, F. and C. Bachmann. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population[J]. Clin Chem, 1994, 40(6): 862-866.
- [14] Harkness, R. A. and R. J. Lund. Cerebrospinal fluid concentrations of hypoxanthine, xanthine, uridine and inosine: high concentrations of the ATP metabolite, hypoxanthine, after hypoxia[J]. J Clin Pathol, 1983, 36(1): 1-8.
- [15] Crawley, J. N. Behavioral phenotyping of rodents[J]. Comp Med, 2003, 53(2): 140-146.
- [16] Zhang, Y. Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat[J]. Brain Res, 2010, 1366: 141-148.
- [17] Ossowska, G. Antidepressants in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced deficit of fighting behavior[J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56(3): 305-311.
- [18] Liu, X. J. Urinary metabonomic study using a CUMS rat model of depression[J]. Magn Reson Chem, 2012, 50(3): 187-192.
- [19] Pan, Y. Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats; restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(1): 122-134.
- [20] Jia, H. M. Integration of (1)H NMR and UPLC-Q-TOF/MS for a comprehensive urinary metabonomics study on a rat model of depression induced by chronic unpredictable mild stress[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63624.
- [21] Zhang, F. Metabonomics study of urine and plasma in depression and excess fatigue rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry[J]. Mol Biosyst, 2010, 6(5): 852-861.
- [22] Wang, X. Metabonomics approach to assessing the modulatory effects of St John's wort, ginsenosides, and clomipramine in experimental depression[J]. J Proteome Res, 2012, 11(12): 6223-6230.
- [23] Su, Z. H. Urinary metabonomics 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.