

桑白皮对肾源性水肿大鼠的代谢组学研究

周 宁^{1,2}, 郑晓珂¹, 王秋红^{3*}, 匡海学², 冯卫生^{1*}, 牛 艳¹
(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040;
3. 广东药科大学, 广东 广州 510224)

摘要: **目的** 运用代谢组学方法研究肾源性水肿大鼠体内的代谢网络及桑白皮对其干预作用。**方法** 检测各组大鼠的血肌酐、尿素氮、白蛋白和尿蛋白水平; 利用 UPLC-QTOF-MS 检测大鼠尿液中代谢产物的变化, 通过主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 筛选出潜在生物标志物; 对生物标志物水平量化处理后, 应用 MeV 软件进行热度图绘制和聚类分析。**结果** 模型大鼠的血肌酐、尿素氮和尿蛋白水平显著升高, 白蛋白水平显著降低, 并表现出明显的氨基酸代谢亢进。由 41 个与模型相关的生物标志物富集得到了 7 条显著受到干扰的代谢途径: 苯丙氨酸代谢, 嘧啶代谢, 精氨酸与脯氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 泛酸和辅酶 A 生物合成, 色氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢。经桑白皮干预后, 模型大鼠的各项生化指标及多数生物标志物水平均有回调趋势, 即代谢紊乱、肾功能损伤和水肿情况均有所改善。**结论** 肾源性水肿模型的发病机理与氨基酸分解代谢加速有关, 桑白皮可通过调节相应代谢而对模型产生干预作用。

关键词: 桑白皮; 肾源性水肿; 代谢组学研究; 热度图; 代谢通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)04-0788-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.005

Metabolic study of *Mori Cortex* on nephrogenic edema in rats

ZHOU Ning^{1,2}, ZHENG Xiao-ke¹, WANG Qiu-hong^{3*}, KUANG Hai-xue², FENG Wei-sheng^{1*}, NIU Yan¹
(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

ABSTRACT: **AIM** To conduct a metabolic research for a better understanding of nephrogenic edema and to assess the integral efficacy of *Mori Cortex* in rat model. **METHODS** The serum creatinine, urea nitrogen, albumin and urinary protein levels in rats were detected. UPLC-QTOF-MS was used to detect the urine metabolites changes, Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) were used to screen potential biomarkers, after whose quantification, Mev software was adopted for heat map drawing and hierarchical cluster analysis. **RESULTS** The model rats manifested significantly increased levels of serum creatinine, urea nitrogen and urinary protein, decreased albumin level, and an obviously excessive amino acid metabolism as well. The 41 identified biomarkers were mainly related to disturbances in phenylalanine, pyrimidine, arginine and proline, glycine, serine and threonine, tryptophan, cysteine and methionine metabolism, and biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. A reversal trend in aforementioned levels of biochemical indexes and most biomarkers due to the intervention by *Mori Cortex* signaled an improvement in the metabolic disorder, renal dysfunction and edema. **CONCLUSION** The metabolic study demonstrates the pathological status of nephrogenic

收稿日期: 2017-08-30
基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2013CB531802)
作者简介: 周 宁 (1984—), 女, 讲师, 从事中药药效物质基础及活性研究。Tel: (0371) 65962746, E-mail: 675974621@qq.com
* 通信作者: 王秋红 (1969—), 女, 博士, 教授, 从事中药炮制、中药药效物质基础及活性研究。Tel: (020) 39352174, E-mail: qhwang668@sina.com
冯卫生 (1960—), 男, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (0371) 60190296, E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

edema and assesses the effect of *Mori Cortex* from an overall perspective, highlighting a new approach for illustrating Chinese medical syndrome and the underlying mechanism in the management of traditional Chinese medicine.

KEY WORDS: *Mori Cortex*; nephrogenic edema; metabolic study; heat map; metabolic pathway

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 性寒, 味甘, 归肺经, 具有泻肺平喘、利水消肿的功效, 主治肺热喘咳, 水肿胀满尿少, 面目肌肤浮肿等症^[1]。目前, 对桑白皮的药理活性研究多集中于泻肺平喘、降糖、降脂、镇痛、消炎等方面^[2], 而其利水消肿及相关机制方面的研究少有报道。《景岳全书·肿胀》中提到: “凡水肿等证乃肺脾肾三脏相干之病, 其本在肾, 标在肺, 制在脾”, 故本研究以肾源性水肿为病理模型, 展开对桑白皮利水作用机制的初步探讨。

相关生化指标的改变能够明确反映模型的病理特征和药物的作用效果, 但对于机制的全面深入探索有限。近年来, 代谢组学的研究方法越来越多地被用于中医药机制研究当中, 缘于其能够获得机体对外界刺激的整体响应, 并从整体代谢水平反映机体的病理状态及给药后的改善情况。因此, 本实验采用代谢组学结合生化指标检测的研究方法, 综合评价肾源性水肿大鼠体内的异常代谢网络, 以及给予桑白皮提取物后对其代谢网络的干预作用, 进而从代谢组学的角度初步阐释肾源性水肿模型的发病机理以及桑白皮的利水作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 180 ~ 220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物与试剂 桑白皮购于河南省顺康医药有限责任公司中草药 31 部, 经河南中医药大学陈随清教授和董诚明教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮。阿霉素注射粉末 (山西普德药业, 国药准字 H14023143, 批号 02160103); 卡托普利 (哈药集团三精制药诺捷有限责任公司, 国药准字 H23022272, 批号 1507491)。乙腈 (Fisher Chemical, 美国, 色谱纯); 甲酸 (Anaqua Chemicals Supply, 美国, 质谱纯); 超纯水 (自制)。

1.3 主要仪器 Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱仪 (Thermo Scientific, 美国); maXis HD 四级杆-飞行时间质谱 (Bruker, 德国); iMark 酶标仪 (Bio-Rad, 美国); Centrifuge-5804R 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国)。

2 实验方法

2.1 供试品的制备 取桑白皮 1 kg, 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 滤过后减压干燥, 备用。

2.2 动物分组、造模与给药 大鼠适应性喂养 1 周后随机分成正常组、模型组、阳性药组和桑白皮组, 每组各 10 只。模型组、阳性药组和桑白皮组首次尾静脉注射阿霉素 4 mg/kg, 8 d 后再次尾静脉注射阿霉素 3.5 mg/kg。造模结束后, 正常组和模型组给予蒸馏水 (1 mL/100 g, 灌胃), 阳性药组和桑白皮组分别给予卡托普利和桑白皮提取物 (234 mg/kg, 灌胃), 连续给药 4 周。

2.3 尿液样品的采集与处理 给药结束后, 收集大鼠 24 h 尿液, -80 ℃ 冻存。进样前, 在冰水浴中解冻, 12 000 × g 条件下离心 10 min, 取上清液加入三倍量乙腈, 涡旋 60 s, 12 000 × g 条件下再次离心 10 min, 吸取上清液置于进样瓶中, 备用。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 色谱分离采用 Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ 色谱柱 (2.2 μm, 2.1 mm × 100 mm; Thermo Scientific, 美国); 进样量 2 μL; 柱温 40 ℃; 体积流量 0.3 mL/min; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 98% ~ 90% A; 1 ~ 9 min, 90% ~ 80% A; 9 ~ 16 min, 80% ~ 70% A; 16 ~ 20 min, 70% ~ 2% A)。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子化源 (ESI), 正、负离子检测模式; 质量扫描范围 m/z 50 ~ 1 500; 毛细管电压分别为 3 500 V (正源) 和 3 200 V (负源); 雾化气压力 200 kPa; 干燥气体积流量 8 L/h, 温度 230 ℃。

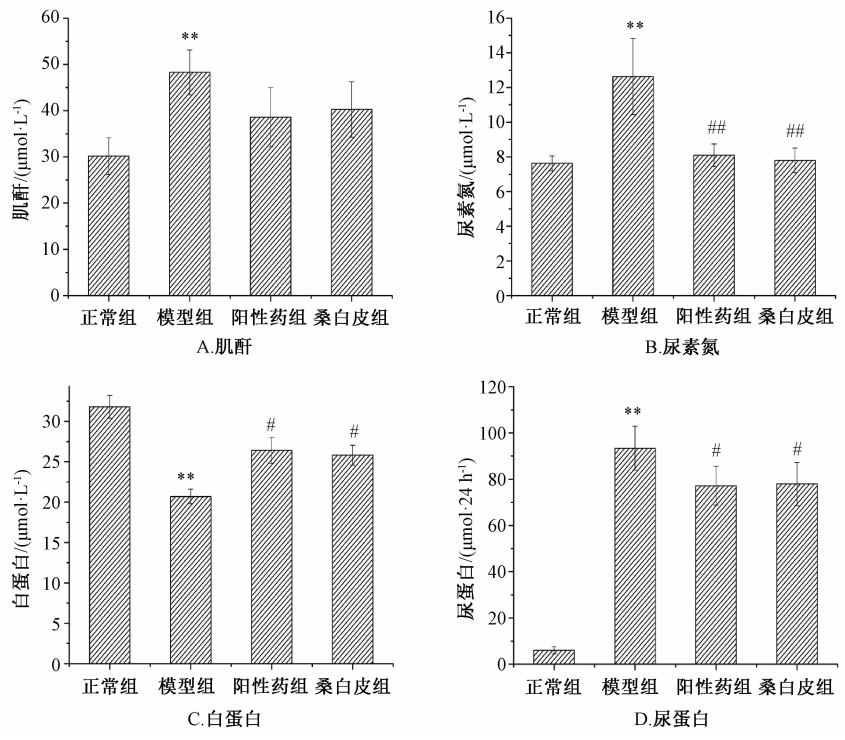
2.5 生化指标的检测 检测各组大鼠尿蛋白以及血中肌酐、尿素氮和白蛋白的水平, 进而对肾源性水肿模型的建立、阳性药的选择以及桑白皮提取物的干预效果进行评价。

2.6 多元统计分析 with 通路构建 首先, 利用仪器配套软件 (Data Analysis) 对原始质谱数据进行校正、峰提取、峰对齐、过滤噪声以及归一化等处理。然后, 将处理后的数据列表导入 SIMCA-P 软件 (13.0 版本, Umetrics AB, 瑞典) 进行多元统计分析, 即主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘

判别分析 (OPLS-DA)^[3]。以 VIP 值 (VIP > 1.5) 和 *t* 检验 (*P* < 0.05) 为筛选条件, 获得潜在生物标志物列表, 并通过 Mev (4.8.0 版本) 软件对生物标志物水平进行聚类分析和热度图绘制。最后, 利用 MBRole database (<http://csbg.cnb.csic.es/mbrole2>) 和 KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 等在线数据库进行代谢通路的富集分析与构建。

3 结果与讨论

3.1 生化指标检测结果 血肌酐和尿素氮能客观



注: 与正常组比较, ***P* < 0.01; 与模型组比较, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01

图 1 肌酐、尿素氮、白蛋白、尿蛋白含量

Fig. 1 Contents of creatinine, urea nitrogen, albumin and urinary protein

3.2 代谢轮廓分析 对尿液样品的检测条件如柱温、体积流量、进样量、流动相组成及洗脱梯度等参数进行优化和筛选后, 得到峰形与分离度均较为理想的基峰色谱图, 如图 2 所示。

对正常组、模型组、阳性药组和桑白皮组样本的代谢轮廓数据进行 PCA 分析, 可发现正常组与模型组样本各自聚为一类, 分离趋势明显 ($R^2X = 0.602$, $Q^2 = 0.428$, 见图 3A), 提示造模后大鼠体内的物质能量代谢受到显著干扰, 代谢物的种类及水平发生明显变化; 而阳性药和桑白皮组样本均呈现出“从模型组区域脱离, 向正常组区域靠近”的趋势 ($R^2X = 0.589$, $Q^2 = 0.418$, 见图 3B), 表明桑白皮提取物及阳性药卡托普利对肾源性水肿大鼠体内的代谢异常均具有一定的干预及纠正效应。

地反映肾小球滤过率, 是临床上评估肾功能损伤的常规指标^[4]。如图 1 所示, 模型大鼠的血肌酐、尿素氮和尿蛋白水平较正常组显著升高, 同时出现低蛋白血症, 提示造模后大鼠肾功能受损并伴有水肿症状^[5], 且两者之间存在密切关联。而给予阳性药卡托普利或桑白皮提取物后, 四项指标均得到一定程度的改善。即阳性药选用合理, 桑白皮提取物可有效修复模型大鼠的肾功能不全, 缓解其水肿症状。

3.3 生物标志物的筛选与鉴定 在 PCA 分析的基础上, 对正常组和模型组样本进行 OPLS-DA 分析 ($R^2X = 0.857$, $Q^2 = 0.976$, 见图 4A), 以确定与模型大鼠体内异常代谢相关的主要内源性代谢物, 并通过 VIP 值 (VIP > 1.5) 和 *t* 检验 (*P* < 0.05) 对潜在生物标志物做进一步筛选 (见图 4B)。筛选完成后, 利用 Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) 和 Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>) 等在线数据库, 对生物标志物进行精确分子量比对以及结构确证, 必要时通过标准品保留时间和二级质谱进行再次确认。最终, 获得 41 个与模型相关的生物标志物 (正离子源模式下 25 个, 负离子源模式下 16 个), 见表 1。

将生物标志物的定量处理结果导入 Mev 软件,

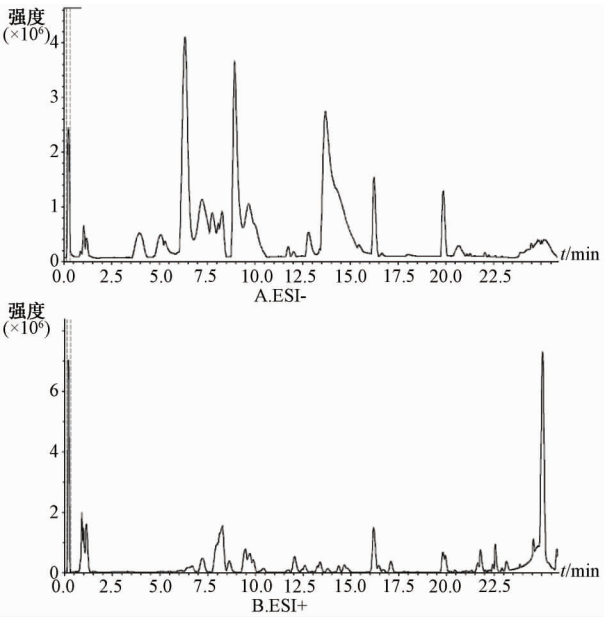


图 2 大鼠尿液基峰色谱图

Fig. 2 Base peak chromatograms of rat urine

进行聚类分析和热度图绘制，结果如图 5 所示。与正常组相比，模型组代谢物水平呈现以升高为主的紊乱态势，而给予桑白皮提取物后，绝大多数代谢物水平向正常值回调。并且在聚类分析的结果中，桑白皮组和正常组亦被归为一类。由此得出，桑白

皮的利尿作用可能与其修复和纠正肾源性水肿大鼠体内的代谢紊乱有关。

3.4 代谢通路的富集与构建 利用 MBrole 在线数据库对生物标志物进行通路富集分析后，共得到 7 条显著受到干扰的代谢途径：苯丙氨酸代谢，嘧啶代谢，精氨酸与脯氨酸代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，泛酸和辅酶 A 生物合成，色氨酸代谢，半胱氨酸和蛋氨酸代谢（表 2）。在此基础上，结合 KEGG 在线数据库中相关代谢通路信息，构建出肾源性水肿模型大鼠的体内代谢网络，结果如图 6 所示。

3.5 桑白皮对肾源性水肿模型的干预作用 阿霉素为含醌结构的蒽环抗生素，给药后在大鼠肾脏内被还原为半醌型自由基，可诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应^[6]，造成足细胞损伤和脱落。一方面可降低肾脏对血浆蛋白的滤过功能^[7]，使大鼠尿蛋白水平升高，血中白蛋白水平降低，继而造成血浆胶体渗透压下降及血浆外渗，加速了水肿的形成和发展^[8]；另一方面可诱导肾小球硬化症、肾小管间质炎症和纤维化^[9]，造成肾血流量及肾小球滤过率降低，进而加重“水钠潴留”及其引发的水肿症状^[8,10]。从实验大鼠一般症状观察及肾功

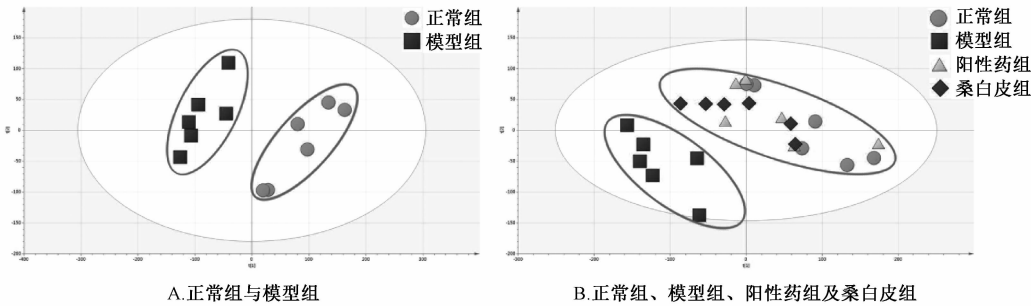


图 3 大鼠尿液 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plots of rat urine

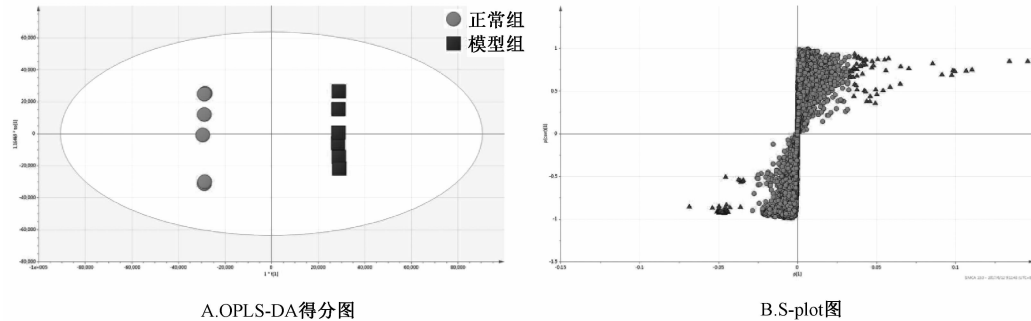


图 4 正常组与模型组样本的 OPLS-DA 得分图和 S-plot 分析

Fig. 4 OPLS-DA score plot and S-plot analysis of samples in normal and model groups

表 1 与肾源性水肿模型相关的潜在生物标志物

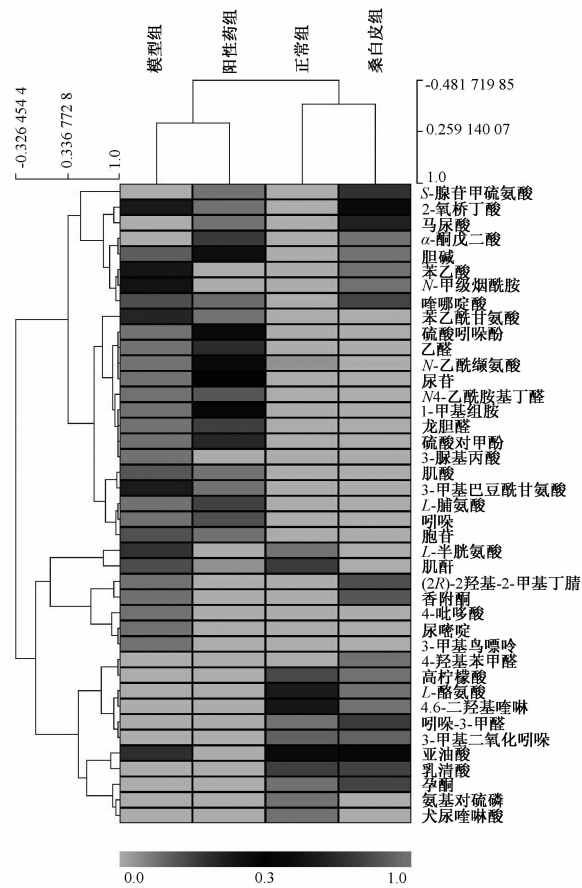
Tab. 1 Potential biomarkers related to nephrogenic edema model

离子源	序号	Metabolites	代谢物	化学式	相对分子质量
ESI ⁻	1	gentisate aldehyde	龙胆醛	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 7
	2	<i>L</i> -tyrosine	<i>L</i> -酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.073 9
	3	aminoparathion	氨基对硫磷	C ₁₀ H ₁₆ NO ₃ PS	261.058 9
	4	<i>S</i> -adenosylmethionine	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸	C ₁₅ H ₂₃ N ₆ O ₅ S	398.137 2
	5	<i>L</i> -cysteine	<i>L</i> -半胱氨酸	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.019 7
	6	hippuric acid	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	179.058 2
	7	uracil	尿嘧啶	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	112.027 3
	8	uridine	尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.069 5
	9	4-pyridoxic acid	4-吡哆酸	C ₈ H ₉ NO ₄	183.053 2
	10	2-oxoglutarate	α-酮戊二酸	C ₅ H ₆ O ₅	146.021 5
	11	indoxyl sulfate	硫酸吲哚酚	C ₈ H ₇ NO ₄ S	213.009 6
	12	<i>N</i> -acetylvaline	<i>N</i> -乙酰缬氨酸	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159.089 5
	13	acetaldehyde	乙醛	C ₂ H ₄ O	44.026 2
	14	phenylacetylglucose	苯乙酰甘氨酸	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	193.073 9
	15	<i>p</i> -cresol sulfate	硫酸对甲酚	C ₇ H ₈ O ₄ S	188.014 3
	16	2-oxobutanoate	2-氧桥丁酸	C ₄ H ₆ O ₃	102.031 7
ESI ⁺	17	quinaldic acid	喹哪啶酸	C ₁₀ H ₇ NO ₂	173.047 7
	18	cyperotundone	香附酮	C ₁₆ H ₂₄	216.187 8
	19	(2 <i>R</i>)-2-hydroxy-2-methylbutanenitrile	(2 <i>R</i>)-2-羟基-2-甲基丁腈	C ₅ H ₉ NO	99.068 40
	20	indoxyl	吲哚	C ₈ H ₇ NO	133.052 8
	21	phenylacetic acid	苯乙酸	C ₈ H ₈ O ₂	136.052 4
	22	3-methylcrotonylglycine	3-甲基巴豆酰甘氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157.073 9
	23	<i>L</i> -proline	<i>L</i> -脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	115.063 3
	24	homocitric acid	高柠檬酸	C ₇ H ₁₀ O ₇	206.042 7
	25	progesterone	孕酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.224 6
	26	<i>N</i> 4-acetylaminobutanal	<i>N</i> 4-乙酰氨基丁醛	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.079
	27	kynurenic acid	犬尿喹啉酸	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189.042 6
	28	cytidine	胞苷	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	243.085 5
	29	creatinine	肌酐	C ₄ H ₇ N ₃ O	113.058 9
	30	orotic acid	乳清酸	C ₅ H ₄ N ₂ O ₄	156.017 1
	31	choline	胆碱	C ₅ H ₁₄ NO	104.107 5
	32	linoleic acid	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 2
	33	indole-3-carboxaldehyde	吲哚-3-甲醛	C ₉ H ₇ NO	145.052 8
	34	4-hydroxybenzaldehyde	4-羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	122.036 8
	35	3-methylguanine	3-甲基鸟嘌呤	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.065 1
	36	3-methyldioxyindole	3-甲基二氧化吲哚	C ₉ H ₉ NO ₂	163.063 3
	37	1-methylhistamine	1-甲基组胺	C ₆ H ₁₁ N ₃	125.095 3
	38	creatine	肌酸	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	131.069 5
	39	<i>N</i> -methylnicotinamide	<i>N</i> -甲基烟酰胺	C ₇ H ₈ N ₂ O	136.063 7
	40	3-ureidopropionate	3-脲基丙酸	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.053 5
	41	4, 6-dihydroxyquinoline	4, 6-二羟基喹啉	C ₉ H ₇ NO ₂	161.047 7

表 2 肾源性水肿模型大鼠的代谢通路富集分析

Tab. 2 Metabolic pathway enrichment analysis of nephrogenic edema model rats

代谢途径	<i>P</i> 值	相关代谢物
苯丙氨酸代谢	1.38 × 10 ⁻⁵	<i>L</i> -酪氨酸, 马尿酸, 乙醛, 苯乙酰甘氨酸, 苯乙酸
嘧啶代谢	4.72 × 10 ⁻⁵	尿嘧啶, 尿苷, 胞苷, 乳清酸、3-脲基丙酸
精氨酸和脯氨酸代谢	2.29 × 10 ⁻⁴	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸, <i>L</i> -脯氨酸, <i>N</i> 4-乙酰氨基丁醛, 肌酐, 肌酸
甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢	3.40 × 10 ⁻⁴	<i>L</i> -半胱氨酸, 2-氧桥丁酸, 胆碱, 肌酸
泛酸和辅酶 A 生物合成	8.21 × 10 ⁻⁴	<i>L</i> -半胱氨酸, 尿嘧啶, 3-脲基丙酸
色氨酸代谢	2.28 × 10 ⁻³	4, 6-二羟基喹啉, 吲哚, 犬尿喹啉酸, 3-甲基二氧化吲哚
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	6.78 × 10 ⁻³	<i>S</i> -腺苷甲硫氨酸, <i>L</i> -半胱氨酸, 2-氧桥丁酸



注：由灰色到黑色代表代谢物水平由低到高

图 5 潜在生物标志物的聚类分析与热度图

Fig. 5 Cluster analysis and heat map of potential bio-markers

能相关生化指标的检测结果来看，阿霉素肾毒性作用的报道得以验证，肾源性水肿模型造模成功，且桑白皮提取物对模型具有一定干预作用，但缺乏对机制的整体评价。代谢组学是研究机体代谢网络对外界刺激的整体响应，因此可从整体代谢的角度为疾病发病机理和药物作用机制研究提供更多参考。

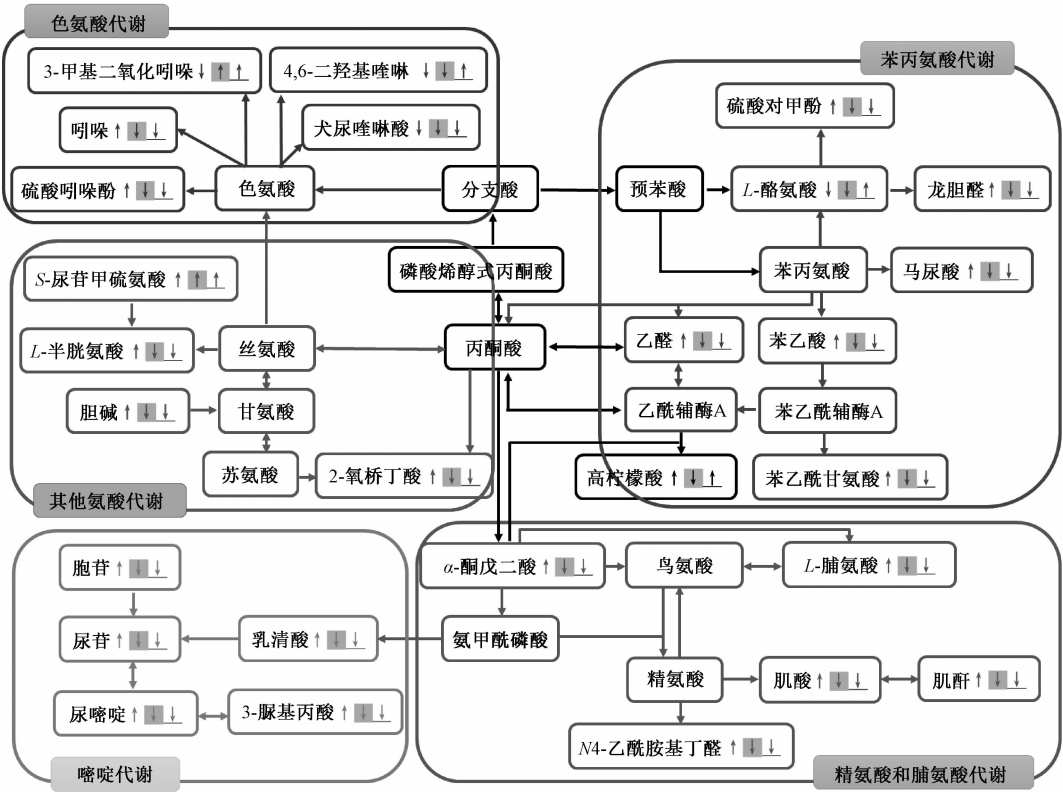
3.5.1 氨基酸代谢亢进与肾功能损伤 氨基酸是合成蛋白质的基本原料，其过度分解代谢所引发的体内氨基酸缺乏，势必影响蛋白质合成，加速蛋白质分解，造成机体营养不良（以白蛋白水平下调为主要表现），并最终加速肾功能损伤及其引发的水肿^[11-12]。如图 6 所示，肾源性水肿模型大鼠体内多数氨基酸的下游代谢产物水平高于正常组，表明模型大鼠体内存在氨基酸过度分解、代谢水平整体亢进的情况；而给予桑白皮提物后，氨基酸整体代谢水平受到合理抑制，即桑白皮提取物可通过抑制模型大鼠的氨基酸分解代谢，提高其氨基酸储备，进而改善机体营养状况以及与之相关的肾脏功

能和水肿情况。

白蛋白是评价肾病患者营养不良的主要指标，血肌酐、尿素氮和尿蛋白是反映肾功能的常规指标。造模后大鼠出现低蛋白血症，且血肌酐、尿素氮和尿蛋白水平显著升高，提示模型大鼠体内存在营养不良和肾功能受损的情况。而给予桑白皮提取物后，四项指标均得以改善。因此，生化指标的检测结果也充分证实了上述说法。

3.5.2 氨基酸代谢与肾脏毒素 马尿酸是苯丙氨酸的主要代谢产物之一，为典型的蛋白结合类肾脏毒素，可抑制肾小管有机酸的排泄，加速肾脏损伤和肾功能恶化；硫酸吡啶和硫酸对甲酚分别是色氨酸和酪氨酸在肠道的微生物代谢产物，两者均具有肾脏毒性^[13]，可通过诱导细胞炎症反应引起肾脏损伤^[14-15]，或通过促进肾脏组织纤维化加重肾功能不全^[16-18]。如图 6 所示，模型大鼠尿液中马尿酸、硫酸吡啶和硫酸对甲酚的水平均高于正常组，提示由于苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的过度分解代谢，使模型大鼠体内产生了过多肾脏毒素。而给予桑白皮提取物后，三种肾脏毒素的水平均有所下降，即桑白皮提取物可通过抑制苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的分解代谢，降低大鼠体内肾脏毒素水平，从而发挥其改善肾脏功能及利水消肿的作用。

3.5.3 精氨酸代谢 L-精氨酸是一种碱性氨基酸，在一氧化氮和酶的催化作用下生成 L-瓜氨酸和一氧化氮（NO），是内生性 NO 的唯一底物^[19]。NO 是一种信号分子，作为内皮依赖性舒张因子，其生物利用度下降（NO 生成减少或者破坏增多）是引起内皮细胞功能障碍的主要原因^[20]。内皮细胞在维持正常的血管稳态中起到关键作用，其严重损伤及随后的修复过程常导致进行性纤维化和肾功能丧失，主要表现为肾脏灌注量减少、持续性肾内缺氧、肾小球滤过率下降等症状^[21-22]，因此，体内精氨酸的水平与肾脏功能密切相关。另有文献报道，证实精氨酸具有修复肾组织损伤和改善肾功能的作用，更加确证了上述说法^[23-24]。如图 6 所示，模型大鼠尿液中精氨酸代谢产物的水平较正常组均有所升高，提示其体内精氨酸水平因分解代谢加速而有所下降；而给予桑白皮提取物后，精氨酸代谢产物的水平均有所回落，提示桑白皮可通过抑制模型大鼠精氨酸的分解代谢，而提高其体内精氨酸水平，进而促进 NO 的合成，改善内皮细胞功能障碍和肾血流量，并最终对肾功能损伤和水肿情况产生正性作用。



注：↑/↓、↑/↓、↑/↓ 分别代表模型组与正常组、阳性药组与模型组、桑白皮组与模型组比较，代谢物水平上调或下调

图 6 肾源性水肿模型大鼠代谢网络
Fig. 6 Metabolic network of nephrogenic edema model rats

4 结论

肾源性水肿模型大鼠体内氨基酸分解代谢水平整体亢进，主要体现在苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸及精氨酸代谢。氨基酸的过度分解代谢造成模型大鼠体内蛋白质合成受阻，血清白蛋白水平下调（营养不良），肾脏毒素水平升高，NO 合成受阻，引发内皮细胞功能障碍和肾血流量降低，均直接或间接导致模型大鼠的肾脏损伤及水肿发生。经桑白皮提取物干预后，代谢通路中绝大多数代谢物水平以及反映肾功能和水肿情况的生化指标均趋于正常，即其可通过抑制苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸及精氨酸的代谢亢进，从而修复肾源性水肿模型大鼠体内的肾脏损伤，并改善其水肿症状。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：298.
[2] 李墨灵，张 晗，夏庆梅. 桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展 [J]. 西部中医药，2017，30 (2)：137-139.
[3] 曲婷丽，王二兵，李震宇，等. 黄芪注射液乙酸乙酯萃取物对小鼠白细胞减少症作用的代谢组学 [J]. 中成药，2017，39 (3)：455-461.

[4] 付玉华，菅建国. 血尿素氮、血肌酐与血清胱抑素 C 联合检测对肾功能损害程度的诊断价值研究 [J]. 中国疗养医学，2017，26 (5)：466-468.
[5] 聂静涛. 防己黄芪汤对原发性肾病综合征水肿期患者的疗效及对 24 h 尿蛋白、血清白蛋白、血脂的影响 [J]. 实用临床医药杂志，2017，21 (1)：48-51.
[6] 姜新猷，胡明昌. 柔红霉素肾病：活性氧诱发脂质过氧化反应引起的肾组织损伤 [J]. 中华肾脏病杂志，1991，7 (2)：74-76.
[7] Jeansson M, Björck K, Tenstad O, et al. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 (1)：114-122.
[8] 费芸芸，吴永贵. 肾病综合征水肿的发病机制及治疗研究进展 [J]. 安徽医学，2011，32 (2)：220-222.
[9] Wang Y, Wang Y P, Tay Y C, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events [J]. Kidney Int, 2000, 58 (4)：1797-1804.
[10] Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology [J]. Clin Exp Nephrol, 2004, 7 (4)：255-259.
[11] 张晓菊，周冬枝，夏欣欣，等. 益肾保真方对慢性肾功能衰竭大鼠营养不良的干预作用 [J]. 西安交通大学学报（医学版），2012，33 (2)：237-240.
[12] 赵 坚. 中医膳食干预慢性肾功能衰竭合并营养不良的疗效分析 [J]. 中国中医药现代远程教育，2014，12 (23)：41-42.

[13] Patel K P, Luo F J, Plummer N S, *et al.* The production of *p*-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(6): 982-988.

[14] Winchester J F, Hostetter T H, Meyer T W. *p*-Cresol sulfate: further understanding of its cardiovascular disease potential in CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54(5): 792-794.

[15] Sun C Y, Hsu H H, Wu M S. *p*-Cresol sulfate and indoxyl sulfate induce similar cellular inflammatory gene expressions in cultured proximal renal tubular cells[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(1): 70-78.

[16] Wang L, Cao A L, Chi Y F, *et al.* You-gui Pill ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 229-238.

[17] Zhang W, Wang W, Yu H, *et al.* Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage[J]. *Hypertension*, 2012, 59(1): 136-144.

[18] Barker S L, Pastor J, Carranza D, *et al.* The demonstration of α Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(2): 223-233.

[19] 马 龙, 吴 昆, 马明福, 等. 左旋精氨酸预处理对老龄大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(2): 89-93, 102.

[20] 于治利, 关立克. 一氧化氮与血管内皮细胞功能障碍[J]. 吉林医学, 2011, 32(2): 318-320.

[21] Perry H M, Okusa M D. Endothelial dysfunction in renal interstitial fibrosis[J]. *Nephron*, 2016, 134(3): 167-171.

[22] Fu J, Lee K, Chuang P Y, *et al.* Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(4): F287-297.

[23] Ghasemi M, Nematbakhsh M, Daneshmand F, *et al.* Role of nitric oxide in kidney and liver (as distance organ) function in bilateral renal ischemia-reperfusion: Effect of *L*-Arginine and NG-nitro-*L*-Arginine methyl ester[J]. *Adv Biomed Res*, 2015, 4: 233-242.

[24] 秦 英. 芪术强肾汤剂配合精氨酸治疗肾小管功能损害的临床疗效分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2014, 2(11): 160-162.

颐脑解郁颗粒抗抑郁作用及其机制

车彦忠¹, 高 松¹, 王保和^{2*}, 杨 奎³

(1. 仲景宛西制药股份有限公司, 河南 郑州 450000; 2. 天津中医药大学, 天津 300000; 3. 成都百康医药工业研究院, 四川 成都 610000)

摘要: **目的** 采用抗嗅球损毁抑郁大鼠模型 (olfactory bulbectomy, OB) 方法观察颐脑解郁颗粒 (郁金、五味子、梔子等) 对抑郁症的治疗作用。**方法** 将大鼠随机分为模型组, 盐酸氟西汀胶囊组, 颐脑解郁颗粒 7.29、3.65、1.82 g 生药/kg 组, 灌胃给药 1 次/d (模型组给予等量纯化水), 连续 2 周。给药前及给药后每周检测体质量、摄食量, 进行液体消耗实验、敞箱实验、残杀实验、避暗被动回避、跳台被动回避。末次给药后 2 h 取血样及脑组织, 采用 ELISA 法检测血清促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇 (CORT)、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 质量浓度, 以及海马单胺类神经递质 5-羟色氨 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 含量。**结果** 与模型组比较, 颐脑解郁颗粒 (7.29 ~ 3.65 g 生药/kg) 能明显增加嗅球损毁抑郁大鼠糖水消耗量 ($P < 0.05$), 明显增加海马组织 5-HT 含量 ($P < 0.05$), 明显延长大鼠避暗犯错误潜伏期和跳台犯错误潜伏期 ($P < 0.05$), 明显减少大鼠水平、垂直运动次数和跳台被动回避试验错误次数 ($P < 0.05$), 明显降低血清 CRH 浓度、降低残杀评分 ($P < 0.05$)。**结论** 颐脑解郁颗粒有抗嗅球损毁致抑郁作用, 其机制可能与调节 5-HT、CRH 有关。

关键词: 颐脑解郁颗粒; 抗抑郁; 5-HT; CRH

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)04-0795-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.006

收稿日期: 2017-10-25

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2014ZX09301307-012)

作者简介: 车彦忠 (1974—), 男, 博士生, 高级工程师, 研究方向为中药新产品开发。Tel: (0371) 86139625, E-mail: yfbwanxi@163.com

* 通信作者: 王保和 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为新药临床评价。Tel: (022) 60335320, E-mail: zhengwenche@163.com