

· 药物代谢 ·

基于代谢组学考察京尼平苷对慢性酒精中毒大鼠的神经保护作用

郭雄健, 卢盛文, 闫广利, 王喜军*

(黑龙江中医药大学 国家中医方证代谢组学研究中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:利用代谢组学技术发现慢性酒精中毒相关的生物标志物,并以标记物为参数评价京尼平苷的神经保护作用,为慢性酒精中毒的诊断和治疗提供参考。方法:采用50%乙醇按 $8\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续灌胃14 d,再递增至 $12\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续灌胃21 d建立慢性酒精中毒大鼠模型;同时,通过连续灌胃给予京尼平苷($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)35 d进行干预治疗。采集大鼠脑及肝组织进行组织病理形态学及生化指标检测。收集尿液并采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间-串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)进行代谢组学分析,色谱条件为ACQUITY UPLC™ HSS T3色谱柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$),流动相0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2.5 min, 1%~11%A; 2.5~4.5 min, 11%~21%A; 4.5~7.0 min, 21%~40%A; 7.0~8.5 min, 40%~99%A; 8.5~10.5 min, 99%A; 10.5~10.6 min, 99%~1%A; 10.6~13.0 min, 1%A),流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,扫描范围 m/z 50~1 200。所得数据利用Progenesis QI 2.0及MassLynx 4.1软件进行分析,通过元素组成及二级碎片与人类代谢组数据库(HMDB)进行匹配来鉴定生物标志物。结果:病理结果显示,在模型复制第35天,与模型组比较,京尼平苷组的脑组织皮层神经元所呈现的排列紊乱、细胞核固缩和深染、细胞膜边界模糊的坏死状态得到明显改善。生化指标结果显示,京尼平苷能提高谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,降低乙酰胆碱酯酶(AChE)活性,降低 β -内啡肽(β -EP)和丙二醛(MDA)的水平。代谢组学结果显示,在模型组大鼠尿液中共鉴定48个慢性酒精中毒生物标志物,涉及色氨酸代谢、嘧啶代谢、苯丙氨酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转换、抗坏血酸和醛酸代谢、甾体激素生物合成、嘌呤代谢7个代谢途径,其中主要为色氨酸代谢的5-羟色胺途径。结论:慢性酒精中毒神经损伤相关的生物标志物主要源于5-羟色胺代谢途径。京尼平苷能够对该途径进行调节,从而改善脑内氧化应激状态发挥神经保护作用。

[关键词] 京尼平苷; 慢性酒精中毒; 代谢组学; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间-串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS); 神经保护; 色氨酸代谢; 氧化应激

[中图分类号] R22;R28;R96;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)12-0155-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220348 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220216.1445.006.html>

[网络出版日期] 2022-02-17 11:38

Investigation of Neuroprotective Effect of Geniposide on Chronic Alcoholism Rats Based on Metabonomics

GUO Xiong-jian, LU Sheng-wen, YAN Guang-li, WANG Xi-jun*

(National Research Center of Chinmedomics, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** Metabonomics was used to identify biomarkers of chronic alcoholism, and to evaluate the neuroprotective effect of geniposide, providing reference for the diagnosis and treatment of chronic alcoholism. **Method:** The rat model of chronic alcoholism was established by intragastric administration of 50% ethanol with $8\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 14 days, and then increased to $12\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 21 days. Meanwhile, the intervention

[收稿日期] 2021-12-09

[基金项目] 黑龙江省教育厅优秀创新人才项目(UNPYSCT-2018221);国家自然科学基金青年基金项目(81703686)

[第一作者] 郭雄健,在读硕士,从事代谢组学研究,E-mail:E1038593924@163.com

[通信作者] *王喜军,博士,教授,博士生导师,从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究,E-mail:xijunw@sina.com

was performed by continuous gavage of geniposide ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 35 days. At the end of the experiment, the biochemical indexes and histopathological morphology of liver and brain tissues of rats were detected. Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used for urine metabonomics. The chromatographic conditions was as follows: ACQUITY UPLC™ HSS T3 column ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$), mobile phase of 0.1% formic acid acetonitrile solution (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-2.5 min, 1%-11% A; 2.5-4.5 min, 11%-21% A; 4.5-7.0 min, 21%-40% A; 7.0-8.5 min, 40%-99% A; 8.5-10.5 min, 99% A; 10.5-10.6 min, 99%-1% A; 10.6-13.0 min, 1% A), the flow rate of $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The conditions of mass spectrometry were electrospray ionization (ESI), positive and negative ion modes, scanning range of m/z 50-1 200. Progenesis QI 2.0 and MassLynx 4.1 were used for data analysis, and biomarkers were identified by matching element composition and secondary fragments with Human Metabolome Database (HMDB). **Result:** The pathological results showed that on the 35th day of model replication, compared with the model group, the cortical neurons in the geniposide group showed a significantly improved state of disorder, nuclear pyknosis, hyperchromatism and cell membrane boundary blurred necrosis. The biochemical results showed that geniposide could significantly increase the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), decrease the activity of acetylcholinesterase (AChE), decrease the levels of β -endorphin (β -EP) and malondialdehyde (MDA). A total of 48 biomarkers of chronic alcoholism were identified by metabonomics, involving seven metabolic pathways of tryptophan metabolism, phenylalanine metabolism, pentose and glucuronate interconversions, pyrimidine metabolism, ascorbate and aldarate metabolism, steroid hormone biosynthesis and purine metabolism. The main pathway is 5-hydroxytryptamine pathway of tryptophan metabolism. **Conclusion:** Biomarkers related to nerve injury in chronic alcoholism are mainly derived from the 5-hydroxytryptamine metabolic pathway. Geniposide can regulate this pathway so as to improve oxidative stress in the brain and play a neuroprotective role.

[Keywords] geniposide; chronic alcoholism; metabonomics; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); neuroprotection; tryptophan metabolism; oxidative stress

区域性调查显示,我国普通成年饮酒年饮酒率超过 59.0%,其中 30~50 岁年龄的饮酒率高达 68.0%~70.3%^[1]。饮酒所造成的急性酒精中毒及成瘾性已经引起了社会的重视,相应机构、法规和医疗处置已较为成熟,但长期饮酒所导致的慢性酒精中毒因潜伏期长且病情隐匿而常常被人忽略。据报道,乙醇及其代谢产物能够通过血脑屏障直接作用于神经系统,长期刺激则会引起氧化应激反应导致神经性损伤^[2-3],表现为脑电图明显改变^[4]、记忆受损^[5]、注意力不集中、运动不协调等^[6]。更有甚者造成脑神经元结构被破坏,导致神经系统退行性改变^[7-8]。由于该改变具有不可逆性,一旦出现临床症状则表明神经系统已受到永久性损伤。然而,目前临床缺乏相关防治方法,患者本身也病感不强,容易错过最佳治疗机会。因此,急需慢性酒精中毒的诊疗方法来控制疾病进程,防止神经系统发生退行性改变。

代谢组学能在未产生临床表现时发现病理条

件下的异常代谢产物,使得诊断窗口前移,适用于慢性疾病的预防^[9-10]。京尼平苷是梔子的有效成分^[11],具有抗肿瘤、保护神经、抗抑郁等活性^[12-15],其中神经保护作用是其活性之一。据报道,京尼平苷可抵抗 β -淀粉样蛋白(A β)的神经毒性^[16],通过激活胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体促进 PC12 神经细胞分化^[17],同时导致血红素氧化酶-1(HO-1)表达增加而降低 PC12 神经细胞的氧化应激损伤^[18],也可通过线粒体途径抑制二氯化钴诱导的 PC12 神经细胞凋亡而发挥神经保护作用^[19],但该成分对乙醇的神经毒性具有药效作用与否的相关研究尚属空白。本课题组前期研究发现,京尼平苷是茵陈蒿汤抗酒精性肝损伤的体内有效成分之一^[20]。在采用代谢组学研究京尼平苷抗酒精性肝损伤作用时发现,其对乙醇引起的苯丙氨酸和色氨酸代谢异常具有调节作用^[21-22],而这 2 种代谢途径都与神经系统直接相关^[23-24],故推测京尼平苷可能在茵陈蒿汤抗急性酒精中毒的过程中发挥了神经保护作用。

基于此,本实验拟通过复制慢性酒精中毒大鼠模型,采用代谢组学方法分析慢性酒精中毒导致神经损伤的生物标志物;在复制模型的同时进行京尼平苷干预,考察京尼平苷对神经损伤生物标志物的影响,探索其作用机制,以期为慢性酒精中毒的诊断和治疗提供参考。

1 材料

ACQUITY™ UPLC型超高效液相色谱仪和SYNAPT™ G2-Si型高分辨质谱分析系统(美国Waters公司),ST-16R型高速低温离心机(德国Thermo Fisher Scientific公司),UNIQUE-R20型多功能超纯水处理系统(厦门锐思捷水纯化技术有限公司),JE1002型电子分析天平(上海浦春计量仪器有限公司),CKX31SF型高清数码显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]。京尼平苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号wkq20011502,纯度≥98%),盐酸纳洛酮注射液(贵州景峰注射剂有限公司,批号20190902),丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、β-内啡肽(β-EP)、超氧化物歧化酶(SOD)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为20200925、20201009、20200922、20201005、20201007),苏木素(美国Sigma公司,批号518-28-3),伊红(北京索莱宝科技有限公司,批号16086-94-8),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲醇为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级8周龄雄性Wistar大鼠,体质量(200±20)g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,合格证号SCXK(辽)2020-0001,室温(22±2)℃,相对湿度40%~60%,12h/12h昼夜循环,自由活动摄食和饮水,实验动物适应性饲养7d后进行实验。本文涉及的动物实验经黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准,批准号2019121101。

2 方法

2.1 给药样品的配置 取京尼平苷对照品适量,精密称定,置于研钵中,加少量甲醇研磨至溶解,逐次加入0.3%羧甲基纤维素钠溶液并不断研磨,配成1.5g·L⁻¹京尼平苷灌胃溶液。取盐酸纳洛酮注射液加适量注射用水稀释配成0.008g·L⁻¹纳洛酮溶液,临用前配制。

2.2 动物给药 将大鼠随机分成空白组、模型组、京尼平苷组和纳洛酮组,每组8只。模型组、京尼平苷组和纳洛酮组在每天上午8点按8mL·kg⁻¹灌胃给予50%乙醇,持续14d,第15天50%乙醇剂量递

增至12mL·kg⁻¹,再连续灌胃21d,复制慢性酒精中毒模型^[25];京尼平苷组大鼠在模型复制的同时每天下午14:00按15mg·kg⁻¹灌胃给予大鼠京尼平苷灌胃溶液;纳洛酮组大鼠在模型复制的同时于每天下午14:00按0.08mg·kg⁻¹腹腔注射纳洛酮溶液;空白组按相同方法给予等量生理盐水。

2.3 组织样本采集及处理 于模型复制第35天依次采集各组大鼠脑、肝组织样本,采集方法为腹腔注射3%戊巴比妥钠(剂量2mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,剖开麻醉大鼠的胸腔并暴露心脏,用止血钳夹住肝门静脉后,用50mL磨顿针头的注射器从左心室下方刺入主动脉,1min内将生理盐水250mL推入其中。灌流后在冰台上取出脑、肝组织,其中左侧脑组织留作组织形态学观察,右侧脑组织用生理盐水制成10%组织匀浆于-80℃保存备用。

2.4 脑组织生化指标检测 取室温解冻后的脑组织样品,按MDA、GSH-Px、AChE、β-EP、SOD试剂盒说明书操作,分别测定其在各组大鼠脑组织中的含量。

2.5 肝脏及脑组织病理学形态检测 脑、肝组织病理切片通过苏木素-伊红(HE)染色观察结构形态。组织石蜡切片于60℃恒温箱烘烤20min进行脱蜡和水化。然后将切片放入苏木素中染色5min,经含0.5%盐酸的70%乙醇分化10s。用水冲洗,将切片放入伊红溶液中染色1min。经梯度乙醇脱水后再用二甲苯透明充分,进行树脂封片。高清数码显微镜拍照分析。

2.6 尿液代谢组学分析

2.6.1 尿液样本采集与处理 在模型复制第35天将各组大鼠放置于代谢笼中,于次日早晨8点收集尿液,将尿液离心15min(13000r·min⁻¹,4℃,离心半径10cm,下同),取上层清液于-80℃保存备用。分析前将尿液样本置于室温下进行解冻,使用移液枪吸取尿液样本200μL于1.5mL离心管中,加入纯水800μL,涡旋60s,超声震荡60s,离心15min,收集上清液过0.22μm微孔滤膜,供超高效液相色谱-四级杆-飞行时间-串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)分析。

2.6.2 色谱条件 ACQUITY UPLC™ HSS T3色谱柱(2.1mm×100mm,1.8μm),流动相选择0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2.5min,1%~11%A;2.5~4.5min,11%~21%A;4.5~7.0min,21%~40%A;7.0~8.5min,40%~99%A;8.5~10.5min,99%A;10.5~10.6min,99%~1%A;10.6~

13.0 min, 1% A), 柱温 40 °C, 进样室温度 4 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL。

2.6.3 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子检测模式, 脱溶剂气流量 796 L·h⁻¹, 脱溶剂气温度 400 °C, 锥孔反吹气流量 50 L·h⁻¹, 离子源温度 110 °C, 锥孔电压 40 V, 毛细管电压 2.5 kV, 扫描范围 *m/z* 50~1 200。

2.6.4 数据处理 尿液代谢数据采用 MassLynx 4.1 分别在正、负离子模式下采集, 所得总离子流图经提取转化为基峰离子流图 (BPI), 导入 Progenesis Q1 (非线性动力学, 2.0 版) 进行峰提取和归一化。数据预处理后自动生成 1 个临时文件, 该文件包含了所有生物信息。然后将所有代谢数据导入 EZinfo 2.0

进行多变量数据分析, 包括主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 分析实验数据, 符合正态分布则数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠脑组织生化指标的影响 与空白组比较, 模型组大鼠脑组织中的 β -EP、MDA 含量和 AChE 活性显著升高 ($P < 0.01$), SOD、GSH-Px 活性则明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 京尼平苷组中的 β -EP、MDA 含量和 AChE 活性明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), GSH-Px、SOD 活性明显增强 ($P < 0.05$), 各指标回调趋势趋向于空白组。见表 1。

表 1 京尼平苷干预慢性酒精中毒大鼠脑组织生化指标的检测 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Detection of biochemical indexes in brain of chronic alcoholism rats treated with geniposide ($\bar{x} \pm s, n=8$)

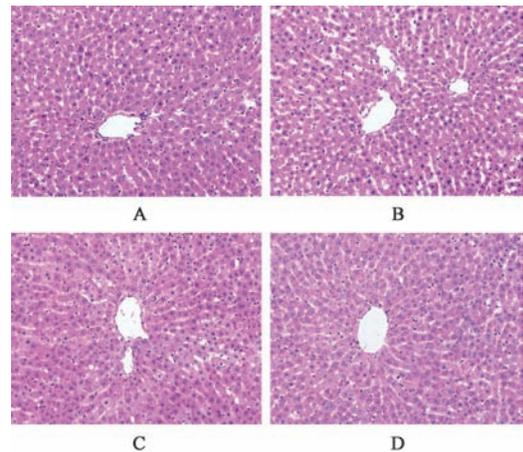
组别	β -EP/ng·L ⁻¹	GSH-Px/ μ g·L ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	AChE/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
空白组	496.62±10.88	53.48±8.63	234.08±43.39	0.32±0.06	13.67±1.30
模型组	512.12±8.63 ²⁾	43.16±7.31 ¹⁾	175.79±16.31 ²⁾	0.42±0.04 ²⁾	17.67±1.68 ²⁾
京尼平苷组	498.95±6.92 ⁴⁾	49.39±3.07 ³⁾	205.59±26.40 ³⁾	0.37±0.03 ⁴⁾	15.49±2.17 ³⁾
纳洛酮组	500.20±13.88	14.53±5.70 ⁴⁾	185.85±17.80	0.40±0.06	15.57±1.31 ³⁾

注: SOD、AChE、MDA 含量以蛋白量计算; 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05, ^{4)}$ $P < 0.01$ (表 2 和图 4 同)

3.2 对大鼠肝脏及脑组织病理学的影响 由 HE 染色结果可知, 空白组大鼠的肝组织细胞排列整齐且结构完整。模型组大鼠的肝组织具有轻微的细胞索紊乱、肝血窦扩张。京尼平苷组大鼠的肝组织也出现一定细胞索紊乱, 但相对于模型组肝血窦扩张情况有所减少, 与纳洛酮组结果相似, 见图 1。各组大鼠大脑皮层 HE 染色结果见图 2, 空白组大鼠皮层神经元细胞排列层次比较清晰, 未见明显异常, 而模型组大鼠皮层神经元排列紊乱, 细胞核固缩深染, 尼氏体溶解细胞膜边界模糊; 京尼平苷组大鼠皮层神经元排列整齐, 与模型组相比视野内神经元坏死数量明显减少。各组大鼠脑组织海马区 HE 染色结果见图 3, 空白组海马区神经元细胞形态正常, 排列整齐。模型组及京尼平苷组细胞形态未见明显异常。

3.3 基于代谢组学分析慢性酒精中毒大鼠的生物标志物及京尼平苷的干预作用

3.3.1 尿液的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 将各组大鼠尿液按 2.6.1 项下方法进行处理, 并根据上述检测条件进行数据采集, 得总离子流数据, 通过降噪和选择离子提取得到含有各组大鼠尿液代谢产物离子信息的 BPI, 见增强出版附加材料, 将各组大鼠尿液



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 京尼平苷组; D. 纳洛酮组 (图 2 和图 3 同)

图 1 京尼平苷干预慢性酒精中毒大鼠肝组织的病理观察 (HE, ×200)

Fig. 1 Pathological observation of liver tissue of rats with chronic alcoholism after intervention of geniposide (HE, ×200)

BPI 导入 Progenesis Q1 进行峰提取和归一化, 得到 20 116 个归一化离子。

3.3.2 代谢组学数据的 OPLS-DA 与 PCA 将各组大鼠尿液代谢数据导入 Progenesis Q1 进行数据归一化处理。为找到慢性酒精中毒生物标志物, 将正、负离子模式下空白组与模型组大鼠的归一化数据

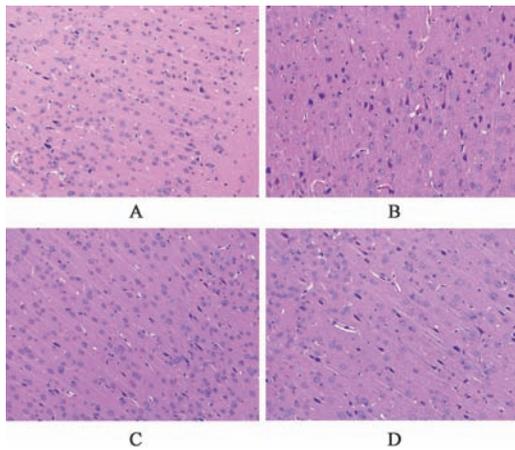


图2 京尼平苷干预慢性酒精中毒大鼠大脑皮层的病理观察(HE, ×200)

Fig. 2 Pathological observation of cerebral cortex of rats with chronic alcoholism after intervention of geniposide (HE, ×200)

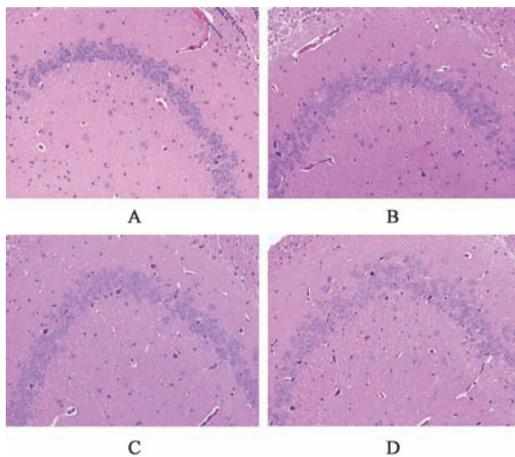


图3 京尼平苷干预慢性酒精中毒大鼠大脑海马区的病理观察(HE, ×200)

Fig. 3 Pathological observation of cerebral hippocampus of rats with chronic alcoholism after intervention of geniposide (HE, ×200)

进行组间 OPLS-DA, 得分图详见增强出版附加材料。两组尿液代谢离子分布的 S-plot 图见增强出版附加材料。图中大部分离子对称分布于 Y 轴, 为组间无差别离子, 而分布于第一、第三象限且远离 Y 轴的离子, 为组间差异贡献较大的离子 (Di), 将这些离子作为慢性酒精中毒生物标志物的筛选范围。以 Di 为评价标准, 评价京尼平苷的回调能力。即将 Di 范围返回各组, 将各组 Di 强度差异作为评价标准, 进行 PCA 处理, 得分图见增强出版附加材料。结果发现在正、负离子模式下模型组与空白组距离最远, 说明 Di 在两组之间的强度差异最大。而京尼平苷组在模型组与空白组的矢量空间之间, 说明模型在连续给予京尼平苷后导致其 Di 集合从原来的模型位置向空白组的 Di 集合移动, 从代谢组学层面

反映了京尼平苷对慢性酒精中毒所引起的机体代谢差异的回调作用。

3.3.3 预防慢性酒精中毒生物标记物的表征 为发现慢性酒精中毒的生物标记物, 对 Di 范围内离子进行变量投影重要性 (VIP) 值排序, 以 VIP 值 > 1 的离子作为候选。利用 Progenesis QI 将候选离子的精确质量数进行元素组成拟合, 并与人类代谢组数据库 (HMDB) 进行匹配。将匹配结果进行二级碎片裂解规律的验证^[26-27]。最终, 在尿液样本中共鉴定出 48 个生物标记物, 其中正离子模式下 25 个、负离子模式下 23 个, 各组大鼠尿液生物标记物的含量用相对丰度表示, 见表 2。二级离子碎片信息见增强出版附加材料。

3.3.4 代谢通路分析 通过对代谢通路进行拓扑分析可以得到各代谢通路的通路影响值 (pathway impact) 和 $-lgP$ 。其中 pathway impact 通过节点气泡半径大小表示, 半径越大, 该值越大。颜色越深表明参与此代谢通路的标记物越多, 在整体代谢轮廓中占比越大。结果发现慢性酒精中毒可引起色氨酸代谢、嘧啶代谢、苯丙氨酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转换、甾体激素生物合成、抗坏血酸和醛酸代谢、嘌呤代谢 7 条途径的代谢异常, 其中色氨酸代谢及苯丙氨酸代谢为慢性酒精中毒的主要异常代谢途径。提示京尼平苷可以对色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢及嘧啶代谢相关通路产生调节作用。其中, 京尼平苷能够对色氨酸代谢异常的 11 个标记物中的 8 个产生调节作用, 尤其是源于 5-羟色胺途径的 5 个代谢异常中的 3 个, 包括 5-甲氧色胺、5-羟基吲哚乙醛和 5-羟基吲哚乙酰甘氨酸, 是京尼平苷抗慢性酒精中毒调节的主要代谢途径。见图 4 和图 5。

4 讨论

本文研究发现, 在连续给予大鼠 50% 乙醇 35 d 后, 肝脏组织仅发现轻微的病理改变, 但皮层神经元出现了明显坏死现象。说明相较于对肝脏的影响, 乙醇的连续刺激对于神经系统的影响更为严重。临床研究也证实乙醇滥用者经长期刺激会导致皮层折叠, 发生异常改变, 进而导致认知功能下降和精神类疾病^[28]。其产生的原因可能与乙醇及其代谢产物透过血脑屏障引起中枢神经系统的慢性氧化应激相关。同时, 本文研究还发现模型大鼠脑内的氧化应激状态, 如脂质过氧化产物 MDA 水平升高、抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性下降、参与抑制自由基的神经介质 β -EP 水平升高, 这些与相关研究的结果一致^[29-32]。此外, AChE 具有促进神经再生

表2 慢性酒精中毒大鼠尿液生物标记物的相对丰度($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Relative abundance of biomarkers in urine of chronic alcoholism rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

No.	生物标记物	分子式	空白组($\times 10^4$)	模型组($\times 10^4$)	京尼平苷组($\times 10^4$)	纳洛酮组($\times 10^4$)
1	<i>N</i> -acetylglucosamine 6-sulfate	C ₈ H ₁₅ NO ₉ S	25.39±4.00	35.22±11.92 ¹⁾	35.46±10.92	32.07±7.24
2	胸腺嘧啶	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	48.69±9.73	31.48±7.29 ²⁾	26.73±3.20	31.87±6.89
3	2-硫酸抗坏血酸	C ₆ H ₈ O ₉ S	299.46±53.64	529.03±107.27 ²⁾	494.70±128.26	489.70±61.70
4	<i>D</i> -葡萄糖醛酸-6,3-丙酮	C ₆ H ₈ O ₆	72.04±11.83	122.94±24.77 ²⁾	113.96±30.59	113.35±14.26
5	<i>L</i> -乙酰基- <i>L</i> -羟脯氨酸	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	18.98±5.75	38.23±8.90 ²⁾	34.53±11.41	30.88±5.58
6	尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	44.60±6.85	57.01±4.88 ²⁾	56.85±10.53	54.86±7.29
7	异白氨酸-羟脯氨酸	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₄	35.83±2.00	42.33±7.23 ¹⁾	36.06±4.97	40.14±9.03
8	吡啶甲酸	C ₆ H ₅ NO ₂	9.85±1.09	12.07±1.47 ¹⁾	14.47±2.30	12.04±1.85
9	胞嘧啶	C ₄ H ₅ N ₃ O	7.79±2.22	13.63±2.05 ²⁾	15.06±5.66	14.15±2.32
10	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	252.44±41.75	345.08±101.08 ¹⁾	310.16±65.89	291.93±54.68
11	多巴胺葡萄糖醛酸苷	C ₁₄ H ₁₉ NO ₈	13.30±6.20	23.91±3.68 ²⁾	31.63±21.83	39.28±11.35 ³⁾
12	3-甲基胞嘧啶	C ₅ H ₇ N ₃ O	12.26±3.51	29.93±3.84 ²⁾	27.18±11.06	23.18±4.99 ³⁾
13	乙基葡萄糖醛酸苷	C ₈ H ₁₄ O ₇	2.23±0.68	16.69±9.04 ²⁾	15.88±13.16	13.89±17.04
14	3-脱氢奎尼酸	C ₇ H ₁₀ O ₆	19.96±5.43	55.31±10.22 ²⁾	53.04±10.04	53.81±9.02
15	二酚葡萄糖醛酸苷	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	24.03±5.11	34.40±7.07 ²⁾	29.01±13.37	30.57±7.81
16	硫酸邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₅ S	38.69±8.92	64.64±9.94 ²⁾	43.08±14.45 ³⁾	54.07±8.84
17	3-吡啶乙腈	C ₁₀ H ₈ N ₂	4.79±0.17	5.40±0.57 ¹⁾	5.12±0.52	5.12±0.61
18	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	1.13±0.14	1.36±0.11 ²⁾	1.51±0.16	1.21±0.11 ³⁾
19	formyl-5-hydroxykynurenamine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	3.22±0.27	3.80±0.14 ²⁾	4.21±0.17 ⁴⁾	3.72±0.66
20	2-羟基-4-甲基苯甲醛	C ₈ H ₈ O ₂	13.39±2.80	7.85±0.69 ²⁾	8.51±1.96	7.88±1.38
21	3-(3-羟基苯基)丙-2-烯酸	C ₉ H ₈ O ₃	33.76±7.56	18.15±2.05 ²⁾	19.43±5.17	18.93±3.98
22	5-磺基水杨酸	C ₇ H ₆ O ₆ S	32.30±9.73	41.91±3.72 ¹⁾	39.30±7.86	37.19±6.20
23	酪醇4-硫酸酯	C ₈ H ₁₀ O ₅ S	7.02±1.43	23.04±15.92 ¹⁾	14.69±4.40	13.21±2.92
24	黄尿酸	C ₁₀ H ₇ NO ₄	12.91±1.80	20.18±4.30 ²⁾	15.80±1.72 ³⁾	18.21±6.82
25	5-羟基吡啶乙酰甘氨酸	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₄	1.74±0.28	1.42±0.07 ¹⁾	2.14±0.44 ⁴⁾	1.93±0.48 ³⁾
26	二苯二硫醚	C ₁₂ H ₁₀ S ₂	16.63±2.58	27.17±6.09 ²⁾	25.44±10.01	27.43±5.60
27	对乙酰氨基酚硫酸酯	C ₈ H ₉ NO ₅ S	19.30±5.22	27.44±7.04 ¹⁾	21.98±3.56	24.11±4.33
28	<i>O</i> -甲基儿茶酚- <i>O</i> -硫酸酯	C ₇ H ₈ O ₅ S	41.21±10.52	56.59±11.22 ¹⁾	35.79±9.68 ⁴⁾	37.32±7.17 ⁴⁾
29	吡啶酮	C ₈ H ₇ NO	12.55±1.07	9.61±2.71 ¹⁾	9.83±2.57	9.11±1.72
30	2,8-二羟基喹啉-β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	C ₁₅ H ₁₅ NO ₈	24.58±9.80	38.76±8.70 ¹⁾	49.23±42.67	42.61±27.25
31	2-吡啶羧酸	C ₅ H ₇ NO ₂	82.01±20.90	118.80±11.55 ²⁾	90.25±28.03 ³⁾	121.37±10.62
32	2-苯基乙酰胺	C ₈ H ₉ NO	114.99±17.05	132.79±8.34 ¹⁾	113.78±43.57	132.42±25.10
33	3-琥珀酰吡啶	C ₉ H ₉ NO ₃	25.83±3.57	31.38±2.95 ²⁾	25.58±7.63	28.64±4.24
34	3-甲基二氧吡啶	C ₉ H ₉ NO ₂	131.78±35.36	217.13±54.91 ²⁾	119.69±22.95 ⁴⁾	212.75±45.77
35	6-羟基-5-甲氧基吡啶葡萄糖醛酸苷	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	281.86±64.58	387.33±78.89 ¹⁾	226.42±40.86 ⁴⁾	365.24±68.35
36	2,6-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄	39.70±6.89	50.08±7.54 ¹⁾	44.65±8.75	42.29±4.91
37	5-甲氧基胺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	16.94±2.84	13.78±1.79 ¹⁾	14.36±2.41	14.17±1.87
38	<i>N</i> -甲基色胺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	14.75±1.45	17.51±1.34 ²⁾	14.87±1.88 ³⁾	15.77±3.18
39	3-醛基吡啶	C ₉ H ₇ NO	15.67±7.50	4.95±1.45 ²⁾	5.49±0.96	8.82±3.36 ³⁾
40	5-phenyl-1,3-oxazinane-2,4-dione	C ₁₀ H ₉ NO ₃	8.19±3.35	2.88±0.69 ²⁾	3.18±0.75	4.50±1.37 ³⁾
41	3-(3-羟基苯基)丙酸	C ₉ H ₁₀ O ₃	1.56±0.17	1.29±0.15 ²⁾	1.52±0.32	1.44±0.14
42	5-甲氧基吡啶乙酸酯	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	5.56±1.33	3.82±1.43 ¹⁾	3.73±0.45	3.57±0.77
43	吡啶丙酮酰甘氨酸	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃	35.34±6.69	17.32±3.22 ²⁾	14.18±2.92	19.51±1.81
44	氨基吡啶丙醇	C ₁₀ H ₁₁ NO	5.18±1.12	3.90±0.67 ¹⁾	5.34±1.14 ³⁾	4.57±1.36
45	2-苯乙醇葡萄糖醛酸	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	269.74±45.84	355.16±34.39 ²⁾	282.20±136.43	340.34±69.49
46	4-乙基苯基硫酸酯	C ₈ H ₁₀ O ₄ S	447.42±136.16	752.57±135.34 ²⁾	552.71±172.11 ³⁾	621.94±115.09
47	5-羟基吡啶乙醛	C ₁₀ H ₉ NO ₂	9.82±1.09	15.70±6.60 ¹⁾	12.71±0.77	11.41±3.27
48	11β-羟孕酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	12.33±10.66	1.06±0.59 ¹⁾	1.50±0.72	1.14±0.39

- [4] 洪远玲. 慢性酒精中毒患者的脑电图改变分析[J]. 中外医疗, 2018, 37(33): 193-194, 198.
- [5] 杜爱林, 张越, 姚良雪, 等. 丁苯酞对急性酒精中毒小鼠海马 γ 网络振荡的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(5): 1139-1143.
- [6] SEGOBIN S H, CHETELAT G, LE BERRE A P, et al. Relationship between brain volumetric changes and interim drinking at six months in alcohol-dependent patients [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38 (3) : 739-748.
- [7] ANKRAH N K, ROSENBLATT M S, Mackey S. Effect of chronic alcoholism on traumatic intracranial hemorrhage [J]. *World Neurosurg*, 2020, 144: e421-e427.
- [8] 洪珊珊, 赵中, 韩伯军, 等. 酒依赖患者认知功能障碍的临床观察[J]. 中国临床心理学杂志, 2017, 25(1): 79-81.
- [9] MASTRANGELO A, BARBAS C. Chronic diseases and lifestyle biomarkers identification by metabolomics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 965: 235-263.
- [10] ZHANG A H, SUN H, WANG X J. Recent advances in metabolomics in neurological disease, and future perspectives [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405 (25) : 8143-8150.
- [11] 刘毓, 张聪聪, 胡永红, 等. 栀子苷对大鼠肝损伤及血清、肝脏、粪便中胆汁酸的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 63-75.
- [12] CHENG F F, MA C Y, SUN L M, et al. Synergistic neuroprotective effects of geniposide and ursodeoxycholic acid in hypoxia-reoxygenation injury in SH-SY5Y cells [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (1) : 320-326.
- [13] ZHAO Y H, LI H Y, FANG F, et al. Geniposide improves repeated restraint stress-induced depression-like behavior in mice by ameliorating neuronal apoptosis via regulating GLP-1R/Akt signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 676: 19-26.
- [14] 刘婧, 黄潇, 付小梅, 等. 基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 135-142.
- [15] 张冰冰, 欧则民, 严林, 等. 栀子总环烯醚萜和总西红花苷的提取纯化工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 156-163.
- [16] YAMAZAKI M, SAKURA N, CHIBA K, et al. Prevention of the neurotoxicity of the amyloid beta protein by genipin [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24 (12) : 1454-1455.
- [17] LIU J H, ZHENG X, YIN F, et al. Neurotrophic property of geniposide for inducing the neuronal differentiation of PC12 cells [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2006, 24(7): 419-424.
- [18] LIU J H, YIN F, ZHENG X, et al. Geniposide, a novel agonist for GLP-1 receptor, prevents PC12 cells from oxidative damage via MAP kinase pathway. [J]. *Neurochem Int*, 2007, 51(6/7): 361.
- [19] GUO L X, LIU J H, XIA Z N. Geniposide inhibits CoCl₂-induced PC12 cells death via the mitochondrial pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(23): 2886-2892.
- [20] WANG X J, SUN H, ZHANG A H, et al. Pharmacokinetics screening for multi-components absorbed in the rat plasma after oral administration traditional Chinese medicine formula Yin-Chen-Hao-Tang by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with pattern recognition methods [J]. *Analyst*, 2011, 136(23): 5068-5076.
- [21] 闫广利, 周小航, 孙晖, 等. 基于代谢组学的茵陈蒿汤及组分配伍对大鼠酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1749-1756.
- [22] ZHANG T L, ZHANG A H, QIU S, et al. High-throughput metabolomics approach reveals new mechanistic insights for drug response of phenotypes of geniposide towards alcohol-induced liver injury by using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 13(1): 73-82.
- [23] 王清平. 苯丙氨酸代谢失调与疾病 [J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(6): 451-453.
- [24] 秦袖平, 安雅婷. 色氨酸-犬尿氨酸代谢通路与神经退行性疾病及中医药干预作用的研究进展 [J]. 天津中医药, 2019, 36(10): 1031-1036.
- [25] 仓怀芹. 硫酸软骨素对慢性酒精中毒大鼠脑损伤的保护作用 [D]. 青岛: 青岛大学, 2010.
- [26] 周曼丽, 俞赟丰, 罗晓欣, 等. 基于LC-MS技术的养心通脉方干预冠心病血瘀证的代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 139-146.
- [27] 王淑, 王信, 孙萍, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的白花蛇舌草干预结肠炎相关结肠癌小鼠血清代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 94-104.
- [28] 戴西勇, 高磊, 余金鸣, 等. 酒精使用障碍患者大脑皮层折叠模式改变的研究 [J]. 罕少疾病杂志, 2021, 28(3): 24-27.
- [29] 刘克洪, 李景琦, 高坚. 普拉格雷干预对脑梗死大鼠

- 神经功能的影响及可能机制[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6038-6041.
- [30] KASHKA R H, ZAVAREH S, LASHKARBOLOUKI T. Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q₁₀[J]. Syst Biol Reprod Med, 2016, 62(6): 404-414.
- [31] 周钰, 李秀娟, 刘欢, 等. 头针联合艾灸对缺血缺氧性脑损伤脑性瘫痪幼鼠记忆与学习能力及脑组织一氧化氮、谷胱甘肽过氧化物酶水平的影响[J]. 河北中医, 2021, 43(1): 107-110, 153.
- [32] 顾静, 吴红彦, 李海龙, 等. 头痛安对偏头痛模型大鼠β-EP、CGRP、ET的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 14-19.
- [33] 姚志彬, 罗潜, 陈以慈, 等. 抑制AChE后对神经再生的影响——AChE可能有神经营养因子样作用[J]. 神经解剖学杂志, 1990, 6(1): 38-42, 135.
- [34] SALTER M, STANLEY J C, FISHER M J, et al. The influence of starvation and tryptophan administration on the metabolism of phenylalanine, tyrosine and tryptophan in isolated rat liver cells [J]. Biochem J, 1984, 221(2): 431-438.
- [35] CHENG H, QIN Y A, DHILLON R, et al. Metabolomic analysis of carbohydrate and amino acid changes induced by hypoxia in naked mole-rat brain and liver [J]. Metabolites, 2022, 12(1): 56.
- [36] WINN S R, SCHERER T, THONY B, et al. Blood phenylalanine reduction corrects CNS dopamine and serotonin deficiencies and partially improves behavioral performance in adult phenylketonuric mice [J]. Mol Genet Metab, 2018, 123(1): 6-20.
- [37] WENDOLOWICZ A, STEFANSKA E, OSTROWSKA L. Influence of selected dietary components on the functioning of the human nervous system [J]. Rocznik Panstw Zakl Hig, 2018, 69(1): 15-21.
- [38] LOVINGER D M. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: An increasingly exciting topic [J]. Neurochem Int, 1999, 35(2): 125-130.
- [39] BORROTO-ESCUELA D O, AMBROGINI P, NARVAEZ M, et al. Serotonin heteroreceptor complexes and their integration of signals in neurons and astroglia-relevance for mental diseases [J]. Cells, 2021, 10(8): 1902.
- [40] PAWLUSKI J L, LI M, LONSTEIN J S. Serotonin and motherhood: From molecules to mood [J]. Front Neuroendocrinol, 2019, 53: 100742.
- [41] BADAWY A A, MORGAN C J, THOMAS R. Tryptophan and 5-hydroxytryptamine metabolism in alcoholism [J]. Alcohol Alcohol Suppl, 1993 (2): 231-235.
- [42] HELANDER A, BECK O, BORG S. The use of 5-hydroxytryptophol as an alcohol intake marker [J]. Alcohol Alcohol Suppl, 1994(2): 497-502.
- [43] ANDERSON G. Tumour microenvironment: Roles of the aryl hydrocarbon receptor, O-GlcNAcylation, acetyl-CoA and melatonergic pathway in regulating dynamic metabolic interactions across cell types-tumour microenvironment and metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 141.
- [44] KUMAR A, GHOSH D, SINGH R L. Amyotrophic lateral sclerosis and metabolomics: Clinical implication and therapeutic approach [J]. J Biomark, 2013, 2013: 538765.

[责任编辑 刘德文]