基于代谢组学技术探讨特色傣药肾茶的“雅解”作用机制

李光^{1,2†}, 李宜航^{1,2†}, 吕亚娜^{1,2}, 李学兰^{1,2}, 陈曦^{1,3*}, 张宁^{4*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所云南分所, 景洪 666100;

2. 西双版纳州傣药南药重点实验室, 景洪 666100;

3. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

4. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 佳木斯 154007

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: 91chenxi@163.com; zhang-ning2006@hotmail.com

收稿日期: 2017-09-09; 接受日期: 2017-12-03; 网络版发表日期: 2018-03-23

国家自然科学基金(批准号: 81503289)、云南省应用基础研究面上项目(批准号: 2016FB143)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2016ZX350065)资助

摘要 中药代谢组学是本草基因组学重要的组成部分, 基于代谢组学技术研究中药及民族药作用机理已成为中药现代化研究的重要手段之一。傣药为中国“四大民族药”之一, 具有完善的理论体系, 其中“雅解”理论是其最具特色的医药理论。“雅解”为傣语, 意译为解药; 肾茶是傣药“解药”之一, 傣族人民长期代茶饮, 临床上具有显著的保健和“解毒”作用。本研究应用液相色谱-质谱联用技术检测给予正常大鼠(*Rattus norvegicus*)肾茶提取物后大鼠尿液和血清中代谢物的变化, 质谱数据采用正交偏最小二乘法判别分析方法寻找正常组和给药组之间的代谢物差异, 并通过变量重要性投影选取潜在生物标志物, 结合质谱信息和数据库检索对潜在生物标志物进行鉴定, 将鉴定到的生物标志物输入MetPA数据库中构建代谢通路和关联网络。结果表明, 两组大鼠尿液和血清中代谢物模式识别得到了很好的区分, 分别发现并鉴定了39个尿液的潜在生物标志物和26个血清的潜在生物标志物, 尿液的生物标志物主要与三羧酸循环、氨基酸代谢、辅酶A生物合成、脂类代谢、嘌呤代谢、胆汁酸合成等13条代谢通路相关, 血清的生物标志物主要与氨基酸生物合成、氨基酸代谢、脂类代谢等5条代谢通路相关。该研究发现, 口服肾茶提取物后可能提高机体基础代谢水平及免疫能力, 同时提高机体对毒素的分解能力从而发挥其“解毒”机制。本研究为阐明肾茶的“雅解”机制提供了科学依据, 同时为扩大肾茶的临床应用以及傣药中其他“雅解”类品种的开发提供了借鉴, 也为丰富传统医药中“治未病”理论的科学内涵提供了参考。

关键词 傣医药, 肾茶, 雅解, 代谢组学

本草基因组学是利用组学技术研究中药基原物种的生物遗传信息及其调控网络, 阐明中药防治人类疾

病分子机制的学科, 从基因组水平研究中药及其对人体作用的前沿科学, 其中代谢组学是其重要的组成部

引用格式: 李光, 李宜航, 吕亚娜, 等. 基于代谢组学技术探讨特色傣药肾茶的“雅解”作用机制. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 455–468
Li G, Li Y H, Lv Y N, et al. Metabolomic study of the mechanism of Dai medicine *Orthosiphon stamineus* on “Jiajie” (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 455–468, doi: 10.1360/N052017-00192

分^[1]。从广义上讲,代谢组学是通过测定鉴别和定量一个复杂生物样本中的所有小分子代谢产物,从而反映整个生物系统在生物刺激和基因调控下动态的代谢反应,其关注的重点在于复杂的细胞系统随着时间发生的系统性变化^[2,3]。与基因组学和蛋白组学相比较,代谢组学具备一定的优势:基因和蛋白质的功能要受表观遗传调控和翻译后修饰才可能产生;代谢物可以直接反应细胞的状态,作为生物活性的特征成分更容易与表型相对应^[4-6]。随着代谢组学技术的发展和完善,其在生物医学中的应用也日益增多,目前代谢组学正越来越多地被用于疾病诊断、发掘疾病发病机制、识别新的药物靶点、定制药物治疗方案和监测、评价治疗结果等^[7-9]。

傣医学是我国四大民族医学之一,因其在产生和发展的过程中深受中医药文化、佛教文化、贝叶文化等因素的影响,逐渐形成以四塔(风、火、水、土)、五蕴(色、识、受、想、行)、“三盘”学说、“雅解”学说为核心的理论体系。“雅解”学说是其最具民族特色的理论之一,核心内容为“未病先解,先解后治”^[10-12]。傣医认为,除了恶劣环境、动物叮咬、食用有毒物质会使得有毒物质进入体内外,空气、水源、食物等均会引起“毒素”在体内的蓄积,不能排除会引发疾病。长期服用“解药”,可以排除毒素,减少发病,傣医的“雅解”理论是傣医学预防医学思想的高度概括^[13]。

现代人类社会被大规模的慢性疾病所拖累,其中大部分由代谢异常引起,包括肥胖、糖尿病和心血管疾病,甚至癌症、呼吸系统疾病等传统认知中非代谢类疾病也与代谢异常密切相关^[14]。各种慢性病往往在出现临床症状之前就存在长时间的代谢异常,器质性疾病变发生之前通过调节代谢,可有效预防疾病发生。

肾茶是傣药“解药”的代表品种之一,傣语被称为“芽糯妙”^[15],为唇形科肾茶属植物 *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu ex H. W. Li (*Orthosiphon stamineus*, OS)的干燥茎叶,其原植物在非洲、东南亚及我国南方多个省均有分布^[16]。肾茶中含有酚酸类、黄酮类、二萜类、三萜类、氨基酸类等多种类型的化合物,在东南亚各国的传统医学中肾茶被广泛地用于治疗风湿病、糖尿病、尿路结石、胆结石、黄疸、水肿等疾病^[17]。傣医学认为肾茶可以清利水道,排除人体内的毒素使人体保持健康。现代药理学研究也证实肾茶具有利尿、降尿酸、降血糖、降血脂、清除自由基

等多种调节代谢异常的作用^[18-22]。

为了进一步解释肾茶作为“解药”的作用机理,阐明“雅解”理论的科学内涵,推进傣药“解药”在大健康产业的应用,本项目采用代谢组学的手段分析肾茶对于健康动物基础代谢水平的影响,从而较为全面地阐明肾茶对于代谢的调节作用和其预防疾病之间的关系,同时为其他“解药”的研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SD大鼠,体重180~200 g,雄性(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号: SCXK(京)2016-0011)。肾茶喷干粉,为肾茶水提液经过喷雾干燥^[23]获得,加蒸馏水溶解后给予动物灌胃,剂量1.10 g/kg,连续给药7天。

1.2 样品采集和处理方法

给药最后一天使用代谢笼收集大鼠(*Rattus norvegicus*) 24 h内的尿液,收集的尿液3000×g离心10 min,取上清液-80℃冻存待测。末次给药1 h后,腹腔注射10 mg/kg水合氯醛麻醉大鼠,由腹腔静脉取血,室温静置30 min,再5000×g离心10 min,取上清液-80℃冻存待测。

尿液及血清样本处理方法:样本在4℃下融化,取100 μL于1.5 mL离心管中加100 μL ddH₂O,振荡5 min,10000×g 4℃离心10 min;上清液使用0.22 μm膜过滤,得到待测样本。

1.3 色谱及质谱条件

色谱仪器采用Waters ACQUITYUPLC,使用ACQUITYUPLC[®]HSST 31.8 μm (2.1 mm×150 mm)色谱柱,自动进样器温度设为4℃,以0.25 mL/min的流速,40℃的柱温,进样3 μL进行梯度洗脱,流动相为0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B)。梯度洗脱程序为0~1 min, 2% B; 1~9.5 min, 2%~50% B; 9.5~14 min, 50%~98% B; 14~15 min, 98% B; 15~15.5 min, 98%~2% B; 15.5~17 min, 2% B。

质谱仪器使用Thermo LTQOrbitrapXL,电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),正负离子电离模式,正离子喷雾电压为4.80 kV,负离子喷雾电压为4.50 kV,

鞘气40 arb, 辅助气15 arb. 毛细管温度325℃, 毛细管电压35 V/-15 V, 管透镜电压50 V/-50 V, 以分辨率60000进行全扫描, 扫描范围50~1000, 并采用CID进行二级裂解, 碰撞电压为30 eV, 同时采用动态排除(重复计数为2)去除无必要的MS/MS信息, 动态排除时间设置为15 s.

1.4 数据处理

通过Proteowizard软件(v3.0.8789)软件进行色谱峰识别和匹配, 利用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)进行数据的模式识别. 通过OPLS-DA模型的S-plot筛选出载荷图上远离远点的化合物为差异代谢物, 以VIP>1和 t 检验 $P \leq 0.05$ 为标准筛选导致组间差异的尿液代谢产物, 而血清的差异代谢物筛选阈值为 $P \leq 0.05$, 并根据精确相对分子量(分子量误差为 $<1 \times 10^{-5}$), 和MS/MS碎片模式, 结合HMDB (Human Metabolome Database) (<http://www.hmdb.ca>), Metlin (<http://metlin.scripps.edu>), massbank (<http://www.massbank.jp/>), LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>), mzcloud (<https://www.mzcloud.org>)数据库进行检索, 对各差异代谢物进行鉴定表征, 将表征后差异代谢物采用导入MetPA metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca)网站中进行代谢通路分析, 将通路影响值大于0定义为相关代谢通路. 随后利用皮尔森相关系数计算差异代谢物之间的相关性, 采取筛选条件为: 相关系数 $r^2 > 0.7$ 和FDR $P < 0.05$, 并利用Cytoscape (2.8.1)软件可视化代谢物关联网络.

2 结果与分析

2.1 代谢组学轮廓分析

在正负离子模式下, 对正常组(Control组, 9只)和口服肾茶提取物组(OS组: *Orthosiphon stamineus*, 9只)的大鼠尿样、血清样品进行LC-MS分析检测, 总离子流基峰谱图见图1. 在同一保留时间段内, Control和OS组基峰谱图中峰数量及面积存在较大差异, 表明肾茶对大鼠的内源性代谢物有一定的影响.

2.2 大鼠尿液和血清代谢组模式识别

为了考察大鼠口服肾茶水提物后代谢物的变化, 本研究采用有监督的OPLS-DA方法分别对大鼠尿液和血清正负离子代谢组学数据进行模式识别, 模型评

价指标见表1, 说明该模型的建模能力和预测能力均较好. 由Control组和OS组的OPLS-DA得分图(图2)可以看出, 在正、负离子模式下, 两组均可显著区分, 无交叉和重叠, 表明口服肾茶水提物干扰了大鼠尿液和血清中部分代谢产物指纹图谱发生显著变化.

2.3 潜在生物标记物的鉴定

通过OPLS-DA分析后, Control组和OS组OPLS-DA的载荷图(图2)中的每一个点代表一个变量, 变量对分类的重要程度(variable importance in the projection, VIP)由其值的大小来衡量, 并根据VIP值对变量进行筛选. VIP>1且具有统计学意义的变量被认为对模型有显著贡献. 尿液的差异代谢物筛选标准满足VIP>1和 t 检验 $P \leq 0.05$, 共筛选181个(正离子94个, 负离子87个)差异代谢物, 血清的差异代谢物筛选标准是 t 检验 $P \leq 0.05$, 共筛选47个(正离子23个, 负离子24个)差异代谢物. 将差异代谢物根据精确分子量进行确认(分子量误差为 $<10^{-5}$), 后续根据MS/MS碎片模式对数据库HMDB, Metlin, Massbank, LipidMaps, Mzcloud中进行检索和确认, 分别鉴定出39个(正离子17个, 负离子22个)尿液的潜在生物标记物(表2和图3), 和26个(正离子18个, 负离子8个)血清的潜在生物标记物(表3和图4). 结合表2和3、图3和4中颜色变化可以清晰看到, 给予肾茶水提物后, 各个差异代谢物在尿液和血清中的含量与Control组相比出现较明显变化, 说明肾茶水提物对大鼠代谢水平具有显著的调节作用.

2.4 差异代谢物的通路分析

为研究肾茶干预正常大鼠机体相关生物标志物涉及的代谢途径, 以及标志物间可能的相互作用关系, 分别将表2和3中鉴定出的标记物输入MetPA数据库中, 构建分析代谢通路. 代谢通路影响值的临界值设置为0, 高于这个值, 将会被选择作为潜在的靶标路径(图5和表4). 当通路影响值高于0时, 大鼠尿液代谢主要与精氨酸和脯氨酸代谢、三羧酸循环、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、丙氨酸, 阿斯帕特酸和谷氨酸酯代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、络氨酸代谢、泛酸盐和辅酶A生物合成、乙醛酸和dicarboxylate代谢、丁酸甲酯的代谢、谷胱甘肽代谢、磷酸肌醇代谢、嘌呤代谢、初级胆汁酸合成等13条代谢通路有关; 而大鼠血清代谢主要与缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸生物合

图 1 大鼠尿液和血清样品总离子流图

A: 尿液样品正离子模式; B: 尿液样品负离子模式; C: 血清样品正离子模式; D: 血清样品负离子模式

图 2 尿液和血清样品的OPLS-DA得分图(网络版彩图)

A: 尿液样品正离子; B: 尿液样品负离子; C: 血清样品正离子; D: 血清样品负离子

表 1 OPLS-DA模型验证参数^{a)}

样品	组别	主成分数	R2X	R2Y	Q2
尿液	Control vs. OS(正离子)	1+3+0	0.542	0.998	0.916
	Control vs. OS (负离子)	1+2+0	0.513	0.993	0.917
血清	Control vs. OS(正离子)	1+1+0	0.17	0.985	0.473
	Control vs. OS (负离子)	1+4+0	0.423	1	0.985

a) R2X: 模型(对X变量数据集)可解释度; R2Y: 模型(对Y变量数据集)可解释度; Q2: 模型可预测度; CV ANOVA: 模型是否为显著性, 用P值表示

成、 β -丙氨酸代谢、鞘脂类代谢、精氨酸和脯氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢5条代谢通路有关。

2.5 差异代谢物关联网络分析

采用皮尔森相关系数分别计算39个尿液和26个血

清的差异代谢物之间的相关性。采取筛选条件为: 相关系数 $r^2 \geq 0.7$ 和FDR $P\text{-value} \leq 0.05$ 。利用Cytoscape软件可视化代谢物关联网络(图6), 通过网络分析发现, 差异代谢物Tartaric acid, Taurine, Threonate和trans-Aconitate在网络中度为11, 说明这4个代谢物在网络中处于

图3 尿液样品差异代谢物热图分析

较为核心的位置。分析4个代谢物结合通路发现, Taurine富集在通路影响值为0.06936的精氨酸和脯氨酸代谢通路中。

2.6 代谢通路网络图

通过查阅文献和KEGG数据库, 将筛选出的血清和尿液样品中的差异代谢物构建代谢通路图(图7), 整合后发现口服肾茶提取物后, 可调节机体糖代谢、氨基酸代谢、核酸代谢、三羧酸循环等, 从而影响机体的基础代谢水平。通过图7可知, 口服肾茶提取物后可上调机体三羧酸循环及 β -丙氨酸代谢, 促进机体能量代谢; 核酸代谢方面可提高机体嘌呤代谢, 降低尿液中尿酸形成, 这与肾茶在临床中降尿酸的功效相吻合;

肾茶还可以上调体内牛磺酸水平从而促进机体脂类代谢, 还可以上调机体乙酰辅酶A表达, 提高机体免疫力, 促进机体的“解毒”能力。

3 结论

生物体系复杂, 具有代谢产物数目多、差异大、浓度分布范围广、组成复杂等特点, 而质谱技术具有高选择和灵敏性、普适性和分析速度快等优势, 可同时检测鉴定多种代谢物, 提供丰富的数据信息, 因此基于质谱技术的代谢组学研究成为阐明生理机制最有效的研究手段之一^[24], 在药物开发、临床疾病、植物学、营养学和环境毒理学等领域发挥着重要的作用^[25]。传统医学在形成过程中受当时基础科学发展水

图 4 血清样品差异代谢物热图分析

图 5 代谢通路分析概要图

A: 尿液样品代谢通路分析概要图; B: 血清样品代谢通路分析概要图

平的限制和古代哲学的影响,形成了以整体观、辩证观等为特点的复杂理论体系,而现代研究开始从系统观、信息结构、复杂性的角度,探索生命现象与疾病本质^[26]。代谢组学可以定量地测定小分子代谢产物的变化,并利用模式识别将这种应答与体内生物学事件相关联,从而确定生物标记物,表征生物体整体的功能状态。傣医学预防医学思想集中体现于解药的“未病

先解”,契合中医养生“治未病”的理念,代谢组学的研究方式与中医学整体观的思想相一致,对阐释中医理论科学性起到了重要作用^[27-31]。

傣族人们习惯将肾茶作为“解药”长期代茶饮,其发挥“解毒”作用过程中也并无器质性病变,因此本文试图应用基于质谱的代谢组学技术从机体基础代谢层面解释傣药肾茶的“雅解”机制。通过分析差异代谢物

表 2 尿液样品中的潜在生物学标记物^{a)}

名称	化学式	加合物	保留时间	质核比	VIP	<i>P</i> 值	Trend
alpha-(Methylenecyclopropyl)glycine	C ₆ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	252.4950	128.07030	5.491	9.75×10 ⁻¹⁴	↑
4-Acetamidobutanoate	C ₆ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	252.3120	146.08087	14.2219	1.54×10 ⁻¹³	↓
<i>N</i> ₄ -Acetylaminobutanal	C ₆ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	276.5950	130.08580	3.93973	3.76×10 ⁻¹¹	↑
t-4-Aminocrotonic acid (TACA)	C ₄ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	151.7350	102.05478	2.0729	1.28×10 ⁻⁷	↑
<i>L</i> -2,3-Dihydrodipicolinate	C ₇ H ₇ NO ₄	[M+H] ⁺	311.2850	170.04428	2.2308	1.41×10 ⁻⁵	↑
12- <i>oxo</i> -10 <i>E</i> -dodecenoic acid	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	[M+H] ⁺	597.9200	213.14797	1.3769	0.00085	↓
4-Aminobutyraldehyde	C ₄ H ₉ NO	[M+H] ⁺	59.9598	88.07543	1.07252	0.002231	↓
3-Dehydrocarnitine	C ₇ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺	294.6350	160.09629	1.07793	0.002242	↑
4-Pyridoxic acid	C ₈ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺	254.8550	184.06004	1.68219	0.002726	↓
<i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -glutamic acid	C ₇ H ₁₁ NO ₅	[M+H] ⁺	207.6450	190.07044	1.24358	0.005364	↑
<i>trans</i> -Aconitate	C ₆ H ₆ O ₆	[M+H] ⁺	167.5820	175.02325	1.91314	0.008477	↑
Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	[M+H] ⁺	167.5955	193.03381	2.0957	0.018182	↓
Hydroxyphenylacetyl glycine	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	[M+H] ⁺	348.3210	210.07546	1.24964	0.02091	↑
<i>L</i> -Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	228.4960	182.08069	1.12499	0.034519	↓
Spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃	[M+H] ⁺	82.7678	146.16472	1.88884	0.046464	↑
PGD2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	649.0000	353.22882	1.84242	0.047815	↓
<i>N</i> -Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (Nudifloramide)	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	248.0390	153.06554	3.65975	0.048721	↓
Tartaric acid	C ₄ H ₆ O ₆	[M-H] ⁻	98.6985	149.00852	19.1166	6.16×10 ⁻¹¹	↑
(<i>S</i>)-2-Hydroxyglutarate	C ₅ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	109.7590	147.02973	1.56952	1.71×10 ⁻⁷	↑
Deoxyinosine	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	[M-H] ⁻	255.1890	251.07853	1.10594	2.19×10 ⁻⁷	↑
2-Furoylglycine	C ₇ H ₇ NO ₄	[M-H] ⁻	311.5010	168.02961	2.58331	3.98×10 ⁻⁶	↑
Allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	[M-H] ⁻	98.1056	157.03611	4.31837	4.33×10 ⁻⁶	↓
Threonate	C ₄ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	94.8972	135.02972	4.9508	6.49×10 ⁻⁶	↓
<i>myo</i> -Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	104.7220	179.05538	2.69133	3.16×10 ⁻⁵	↓
Salicyluric acid	C ₉ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	462.7460	194.04494	2.04045	9.32×10 ⁻⁵	↓
Gluconic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	92.9132	195.05000	3.67987	0.000151	↑
2-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	417.5685	151.03956	1.47647	0.000439	↓
Uric acid	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	[M-H] ⁻	157.8240	167.02051	2.72131	0.00049	↓
Dihydro-3-coumaric acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	469.9950	165.05532	5.70947	0.000587	↑
2-Keto-3-deoxy- <i>D</i> -gluconic acid	C ₆ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	102.3135	177.03979	1.08929	0.002168	↓
<i>L</i> -Erythrose	C ₄ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	117.4860	119.03570	1.89124	0.009189	↓
Citraconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	190.7240	129.01922	2.08349	0.020578	↑
Taurine	C ₂ H ₇ NO ₃ S	[M-H] ⁻	89.0341	124.00743	2.4092	0.024776	↓
Dodecanedioic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	[M-H] ⁻	599.0310	229.14317	1.64815	0.028628	↓
3-Furoic acid	C ₅ H ₄ O ₃	[M-H] ⁻	190.5810	111.00895	1.46232	0.031789	↓
Succinic acid semialdehyde	C ₄ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	131.7545	101.02538	2.08814	0.032056	↑
Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	[M-H] ⁻	298.6400	218.10211	1.57646	0.035065	↓
Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	[M-H] ⁻	200.0575	115.00345	1.07164	0.036464	↑
p-Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	380.6860	137.02409	1.6178	0.049429	↑

a) 在OS组和control组比较中, ↑和↓分别代表上调和下调

表 3 血清样品中的潜在生物标记物

名称	化学式	加合物	保留时间	质核比	<i>P</i> 值	Trend
beta-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	90.5694	90.05428	9.75×10 ⁻¹⁴	↓
Hexanone	C ₆ H ₁₂ O	[M+H] ⁺	125.985	101.0953	1.54×10 ⁻¹³	↓
Cytosine	C ₄ H ₅ N ₃ O	[M+H] ⁺	107.301	112.0497	3.76×10 ⁻¹¹	↓
<i>L</i> -Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	104.566	116.0702	1.28×10 ⁻⁷	↓
<i>L</i> -Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	[M+H] ⁺	91.8218	120.0646	1.41×10 ⁻⁵	↑
<i>DL</i> -pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	110.9265	130.0852	0.00085	↑
<i>L</i> -Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	247.905	132.1005	0.002231	↓
<i>L</i> -Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	[M+H] ⁺	160.482	150.0569	0.002242	↓
<i>L</i> -Theanine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	104.709	175.1064	0.002726	↓
C16 Sphinganine	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	[M+H] ⁺	704.429	274.2719	0.005364	↑
Sphingosine	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	[M+H] ⁺	776.467	300.2873	0.008477	↑
Sphinganine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	[M+H] ⁺	759.9165	302.3029	0.018182	↑
3-Buten-1-amine	C ₄ H ₉ N	[M+H] ⁺	149.142	72.08	0.02091	↓
Pyridine	C ₅ H ₅ N	[M+H] ⁺	687.82	80.04863	0.034519	↑
Piperidine	C ₅ H ₁₁ N	[M+H] ⁺	247.898	86.09566	0.046464	↓
delta-Valerolactam	C ₅ H ₉ NO	[M+H] ⁺	63.1996	100.075	0.047815	↓
Serotonin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	274.3745	177.1009	0.048721	↑
Deoxycytidine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	108.479	228.0959	6.16×10 ⁻¹¹	↓
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	550.6895	137.024	1.71×10 ⁻⁷	↑
Tartaric acid	C ₄ H ₆ O ₆	[M-H] ⁻	100.829	149.0084	2.19×10 ⁻⁷	↑
4-Hydroxybenzenesulfonic acid	C ₆ H ₆ O ₄ S	[M-H] ⁻	375.339	172.9904	3.98×10 ⁻⁶	↑
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	440.2265	121.0295	4.33×10 ⁻⁶	↓
Creatine	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M-H] ⁻	102.4545	130.062	6.49×10 ⁻⁶	↓
Oxoglutaric acid	C ₅ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	110.0585	145.0135	3.16×10 ⁻⁵	↑
Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	[M-H] ⁻	95.4544	174.0875	9.32×10 ⁻⁵	↓
Phenylacetyl glycine	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	431.575	192.0651	0.000151	↑

的表达及其相关代谢通路发现, 给予肾茶提取物后, 会引起机体三羧酸循环、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、能量代谢等代谢途径的改变. 参与本研究机体代谢通路中, 柠檬酸是三羧酸循环的中间产物, 三羧酸循环是机体获得能量的主要方式, 三羧酸循环缺陷可能会引起机体肿瘤形成^[32]; 丙氨酸参与了多种代谢途径, 也是能量来源之一, 还是糖代谢和免疫系统的重要氨基酸, 为机体提供能量, 随着研究的深入, 学者发现丙氨酸代谢参与多种代谢类疾病的发生, 例如, 谷丙转氨酶可能是 II 型糖尿病的代谢标志物^[33]. 精氨酸可有效提高免疫力、促进免疫系统分泌自然杀伤细胞、吞噬细胞、白血球内烯素(interleukin-1)等内生性物质, 还可

通过作用于 mTOR 复合体 I (mTORC1)^[34,35] 进而参与对抗癌细胞及预防病毒感染, 精氨酸代谢在调节先天免疫和适应性免疫中同样具有重要作用^[36]. 辅酶 A 是体内 70 多种酶反应通路的辅助因子, 包括糖类的分解, 脂肪酸的氧化, 氨基酸的分解, 丙酮酸的降解, 激发三羧酸循环, 提供机体生命所需 90% 的能量, 辅酶 A 参与机体大量必需物质的合成. 除此之外, 辅酶 A 代谢还参与自噬^[37,38]、II 型糖尿病发病、发挥减肥作用^[39], 以及参与神经递质生成促进大脑学习能力等作用^[40]. 辅酶 A 支持机体免疫系统对有害物质的分解、激活白细胞、促进血红蛋白的合成、参与抗体的合成, 减轻抗生素及其他药物引起的毒副作用, 同时可通过蛋白乙

图 6 代谢物关联网络分析

各个圆表示各种代谢物, 其间的连线表示代谢物与代谢物之间显著相关性, 其中红色表示正相关, 蓝色表示负相关。A: 尿液样品代谢物关联网络分析; B: 血清样品代谢物关联网络分析

图 7 口服肾茶提取物对代谢通路的影响
其中红色为上调, 绿色为下调

表 4 尿液样品中MetPA独特代谢通路分析结果^{a)}

通路名称	Total	Hits	Compounds	Raw <i>P</i>	Impact
Arginine and proline metabolism	44	6	4-Aminobutyraldehyde, Spermidine, <i>N</i> ₄ -Acetylaminobutanol, Fumaric acid, <i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -glutamic acid, 4-acetamidobutanoate	0.000553	0.06936
Phenylalanine metabolism	9	2	2-Hydroxyphenylacetic acid, <i>L</i> -Tyrosine	0.019531	0
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	3	1	<i>L</i> -Tyrosine	0.07309	0
beta-Alanine metabolism	19	2	4-Aminobutyraldehyde, Spermidine	0.079405	0
Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	Citric acid, Fumaric acid	0.086878	0.08044
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	1	<i>L</i> -Tyrosine	0.096279	0.5
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	2	Succinic acid semialdehyde, Fumaric acid	0.11868	0.06645
Taurine and hypotaurine metabolism	8	1	Taurine	0.18353	0.42857
Ascorbate and aldarate metabolism	9	1	myo-Inositol	0.20403	0
Vitamin B6 metabolism	9	1	4-Pyridoxic acid	0.20403	0
Nicotinate and nicotinamide metabolism	13	1	<i>N</i> -Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (Nudifloramide)	0.28114	0
Tyrosine metabolism	42	2	Fumaric acid, <i>L</i> -Tyrosine	0.28239	0.14045
Pantothenate and CoA biosynthesis	15	1	Citric acid	0.31692	0.02041
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	16	1	Succinic acid semialdehyde	0.33416	0.2963
Butanoate metabolism	20	1	myo-Inositol	0.39898	0.02899
Galactose metabolism	26	1	Spermidine	0.48486	0
Glutathione metabolism	26	1	myo-Inositol	0.48486	0.01145
Inositol phosphate metabolism	26	1	Deoxyinosine	0.48486	0.13525
Purine metabolism	68	2	Deoxyinosine, Uric acid	0.51402	0.02557
Arachidonic acid metabolism	36	1	PGD2	0.60221	0
Primary bile acid biosynthesis	46	1	Taurine	0.69342	0.02976
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	1	<i>L</i> -Tyrosine	0.8237	0

a) Total, 目标代谢通路中代谢物的总数; Hits, 目标代谢通路中差异代谢物数量, Raw *P*, 超几何分布检验的*P*值; Compounds, 差异代谢物; Impact, 代谢通路影响值, 越大越好

表 5 血清样品中MetPA独特代谢通路分析结果

通路名称	Total	Hits	Compounds	Raw <i>P</i>	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	2	<i>L</i> -Methionine, <i>L</i> -Isoleucine, <i>L</i> -Proline	0.052287	0
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	11	1	<i>L</i> -Isoleucine	0.061219	0.33333
Pantothenate and CoA biosynthesis	15	1	beta-Alanine	0.082653	0
beta-Alanine metabolism	19	1	beta-Alanine	0.10366	0.44444
Propanoate metabolism	20	1	beta-Alanine	0.10884	0
Sphingolipid metabolism	21	1	Sphinganine	0.114	0.14286
Valine, leucine and isoleucine degradation	38	1	<i>L</i> -Isoleucine	0.19779	0
Pyrimidine metabolism	41	1	beta-Alanine	0.21183	0
Arginine and proline metabolism	44	1	<i>L</i> -Proline	0.22566	0.064
Cysteine and methionine metabolism	28	1	<i>L</i> -Methionine	0.21577	0.09464

酰化起到抗衰老作用^[41]。谷胱甘肽代谢能够促进机体对毒素的排泄,能够有效清除体内自由基,可预防帕金森疾病^[42,43],提高机体免疫力。嘌呤代谢参与阿尔茨海默病^[44,45]、帕金森^[46]、痛风等疾病^[47],能够有效降低尿酸的形成,这也是解释肾茶在临床中功效的有力证据。

通过分析口服肾茶提取物后对代谢通路的影响可知,肾茶发挥“雅解”的机制,一方面可通过参与能量代谢、氨基酸代谢等提高机体基础代谢水平从而提高机体免疫力,另一方面可提高分解机体毒素的作用从而

达到“解毒”的作用。同时通过分析结果可知,口服肾茶提取物后参与多种代谢通路,对II型糖尿病、帕金森疾病、阿尔茨海默病、痛风等疾病的具有潜在的治疗活性,与前期研究相吻合^[48-50],这对解释其作用机理具有指导作用。

本文的研究是对傣药肾茶“雅解”机制的探讨,对推动傣医药理论的科学发展具有重要意义,但由于傣医药研究时间较短,基础研究相对缺乏,也只是处于理论阶段,有待于进一步科学实验验证,这也将成为本课题组后期研究的重点。

致谢 本研究在实验设计及文章撰写方面受到中国医学科学院药用植物研究所宋经元研究员及黑龙江中医药大学王喜军教授的诸多指导,在此一并表示感谢!

参考文献

- 1 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. 中国中药杂志, 2016, 41: 3881-3889
- 2 Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: metabonomics. *Nature*, 2008, 455: 1054-1056
- 3 Nicholson J K, Wilson I D. Understanding “Global” systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 668-676
- 4 Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 451-459
- 5 王广基, 查伟斌, 郝海平, 等. 代谢组学技术在中医药关键科学问题研究中的应用前景分析. 中国天然药物, 2008, 6: 89-97
- 6 Patti G J, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 263-269
- 7 Idle J R, Gonzalez F J. Metabolomics. *Cell Metab*, 2007, 6: 348-351
- 8 Edlund A, Garg N, Mohimani H, et al. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 473-484
- 9 Ramoni R B, Mulvihill J J, Adams D R, et al. The undiagnosed diseases network: accelerating discovery about health and disease. *Am J Hum Genet*, 2017, 100: 185-192
- 10 张超. 傣医基础理论. 北京: 中国中医药出版社, 2007. 25-26
- 11 唐璟璐. 傣医“雅解”学说运用规律的初步研究. 硕士学位论文. 昆明: 云南中医学院, 2012
- 12 方洁, 许建新. 傣医“雅解”发展与应用. 中国中药杂志, 2012, 37: 2190-2192
- 13 唐璟璐, 周红黎, 郑进. 傣医“雅解”学说与亚健康防治的探讨. 中国民族医药杂志, 2010, 16: 8-9
- 14 Newgard C B. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? *Cell Metab*, 2017, 25: 43-56
- 15 赵应红, 林艳芳, 张丽丽, 等. 傣药芽糯妙(肾茶)的研究与应用. 中国民族医药杂志, 2008, 72: 72-77
- 16 Ameer O Z, Salman I M, Asmawi M Z, et al. *Orthosiphon stamineus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J Med Food*, 2012, 15: 678-690
- 17 Perpustakaan Ugm I. A new prenylated flavanone from the arial part of *Orthosiphon stamineus*. *Eur J Soil Sci*, 2008, 56: 717-725
- 18 Akowuah G A, Ismail Z, Norhayati I, et al. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem*, 2005, 93: 311-317
- 19 Olah N K, Radu L, Mogoşan C, et al. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2003, 33: 117-123
- 20 Sriplang K, Adisakwattana S, Rungsipipat A, et al. Effects of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract on plasma glucose concentration and lipid

- profile in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109: 510–514
- 21 Adam Y, Somchit M N, Sulaiman M R, et al. Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 154–158
 - 22 Mohamed E A H, Yam M F, Ang L F, et al. Antidiabetic properties and mechanism of action of *Orthosiphon stamineus* Benth bioactive sub-fraction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Acupunct Meridian Studies*, 2013, 6: 31–40
 - 23 李光, 李宜航, 李学兰, 等. 肾茶水提物喷雾干燥工艺优化考察. 医药导报, 2013, 265: 1474–1477
 - 24 王献, 林树海, 蔡宗苇. 基于质谱技术的代谢组学研究及其在中国的发展. 中国科学: 化学, 2014, 44: 724–731
 - 25 Gika H G, Theodoridis G A, Plumb R S, et al. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2014, 87: 12–25
 - 26 贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用. 中国中药杂志, 2006, 31: 621–624
 - 27 刘萍, 程静, 陈刚, 等. 应用代谢组学研究“肺与大肠相表里”理论的思路和方法. 辽宁中医杂志, 2011, 38: 428–430
 - 28 季幸妹, 周福生, 侯丽颖. 应用代谢组学探讨脾虚证候理论实质的研究思路. 中华中医药学会脾胃病分会第二十次全国脾胃病学术交流会论文汇编. 2008
 - 29 甄毕贤, 贾连群, 杨关林. 基于代谢组学技术探讨脾主运化统血等脾脏象理论科学内涵. 时珍国医国药, 2015, 26: 412–414
 - 30 黄晓晨, 宿树兰, 郭建明, 等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考. 中草药, 2014, 45: 147–153
 - 31 于兰, 金鑫, 南红梅. 代谢组学技术在中医“整体观念、辨证论治”理论研究中的应用. 中国继续医学教育, 2015, 7: 191–192
 - 32 Selak M A, Armour S M, MacKenzie E D, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 2005, 7: 77–85
 - 33 Vozarova B, Stefan N, Lindsay R S, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51: 1889–1895
 - 34 Chantranupong L, Scaria S M, Saxton R A, et al. The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway. *Cell*, 2016, 165: 153–164
 - 35 Wang S, Tsun Z Y, Wolfson R L, et al. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*, 2015, 347: 188–194
 - 36 Rodriguez P C, Ochoa A C, Al-Khami A A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Front Immunol*, 2017, 8: 93
 - 37 Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, et al. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell*, 2014, 53: 710–725
 - 38 Eisenberg T, Schroeder S, Andryushkova A, et al. Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme A stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell Metab*, 2014, 19: 431–444
 - 39 Swerdlow D I, Preiss D, Kuchenbaecker K B, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet*, 2015, 385: 351–361
 - 40 Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, et al. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid β -peptide. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 905–912
 - 41 Schroeder S, Pendl T, Zimmermann A, et al. Acetyl-coenzyme A. *Autophagy*, 2014, 10: 1335–1337
 - 42 Smeyne M, Smeyne R J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radical Biol Med*, 2013, 62: 13–25
 - 43 Parmeggiani B, Moura A P, Grings M, et al. *In vitro* evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci*, 2015, 42: 68–75
 - 44 Ansoleaga B, Jové M, Schlüter A, et al. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2015, 36: 68–80
 - 45 Xiang Z, Xu M, Liao M, et al. Integrating genome-wide association study and brain expression data highlights cell adhesion molecules and purine metabolism in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2015, 52: 514–521
 - 46 Garcia-Esparcia P, Hernández-Ortega K, Ansoleaga B, et al. Purine metabolism gene deregulation in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41: 926–940
 - 47 Balasubramaniam S, Duley J A, Christodoulou J. Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *J Inherit Metab Dis*, 2014, 37: 669–686
 - 48 李光, 陈曦, 路娟, 等. 肾茶水提物喷干粉对链脲霉素所致糖尿病大鼠降血糖作用机制研究. 中华中医药杂志, 2013, 28: 3653–3656
 - 49 汪泽栋, 李宜航, 陈曦, 等. 肾茶水提物喷干粉对D-半乳糖所致衰老小鼠学习记忆功能的影响. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 1649–1652
 - 50 游建军, 李光, 李宇赤, 等. 肾茶总黄酮对帕金森病的神经保护作用. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21: 139–143

Metabolomic study of the mechanism of Dai medicine *Orthosiphon stamineus* on “Jiajie”

LI Guang^{1,2}, LI YiHang^{1,2}, LV YaNa^{1,2}, LI XueLan^{1,2}, CHEN Xi^{1,3} & ZHANG Ning⁴

¹ Yunnan Branch, Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China;

² Key Laboratory of Dai and Southern Medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Jinghong 666100, China;

³ Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100093, China;

⁴ Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China

Herb genomics constitutes the metabolomics of Chinese medicine. Dai medicine is one of the “four national medicines” in China, which are based on a theoretically perfect system, and “Jiajie” has a unique medical theory. *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu (Lamiaceae) (*Orthosiphon stamineus* Thunb., OS), is one of the Dai “antidote” medicines and has significant health care applications and “detoxification” properties in the clinical setting. This study used HPLC-MS to detect changes in metabolites in rat urine and serum after the oral administration of OS extract. The orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) method was employed to analyze metabolites of rat urine and serum in OS and control groups, and 39 differential metabolites in urine and 26 in serum were screened out. Finally, related metabolic pathways were analyzed using the MetaboAnalyst website. The oral administration of OS extract mainly affected the citrate cycle (TCA cycle), taurine and hypotaurine metabolism, tyrosine metabolism, and sphingolipid metabolism pathways. Our findings suggested that oral OS extract administration may improve basic metabolite levels and immunity in humans by improving the detoxification ability of the body through an “antidote” mechanism. This study provides a scientific basis for elucidating the mechanism underlying “detoxification” by OS. Moreover, this study offers a point of reference for the clinical application of OS, development of “Jiajie” species in the Dai medicine, and the clarification of “preventive treatment of disease” theory in traditional Chinese medicine.

Dai medicine, *Orthosiphon stamineus*, Jiajie, metabolomics

doi: [10.1360/N052017-00192](https://doi.org/10.1360/N052017-00192)