

基于尿液代谢组学研究玄参对阴虚火旺甲亢大鼠的 滋阴降火作用机制

张 宁^{1,2}, 李自辉¹, 赵洪伟¹, 庞 牧¹, 刘树民^{3*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵州 贵阳 550001;
3. 黑龙江中医药大学药物安全性评价中心, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 中药玄参是滋阴降火的要药, 临床可用于治疗阴虚火旺甲亢, 但其作用机制尚不明确。本研究以玄参治疗阴虚火旺甲亢作用机制为目的, 采用优甲乐 (左甲状腺素钠片) 所致的大鼠阴虚火旺甲亢模型。基于超高效液相色谱串联质谱联用技术的尿液代谢组学方法进行研究。结果显示, 玄参可缓解阴虚火旺甲亢症状, 经尿液代谢轮廓分析发现脯氨酸二甲内盐、雌酮、胸苷、5-羟吲哚乙酸、环磷酸腺和左旋多巴这 6 个差异代谢物可能是玄参治疗阴虚火旺甲亢的潜在代谢标志物, 其涉及相关性最强的通路有色氨酸代谢、嘧啶代谢、酪氨酸代谢、嘌呤代谢和甾体激素类生物合成这 5 条代谢路径。本研究运用尿液代谢组学方法揭示了玄参干预阴虚火旺甲亢的作用机制, 为玄参“滋阴降火”功效的临床应用提供了理论依据。

关键词: 玄参提取物; 阴虚火旺甲亢; 滋阴降火; 尿液代谢组学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1843-09

Study on Radix Scrophulariae for the treatment of hyperthyroidism rat model of yin deficiency based on urine metabonomics

ZHANG Ning^{1,2}, LI Zi-hui¹, ZHAO Hong-wei¹, PANG Mu¹, LIU Shu-min^{3*}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;

3. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: The Chinese herbal Radix Scrophulariae is the main medicine for nourishing yin and reducing fire. It can be used to treat hyperthyroidism due to yin deficiency and fire hyperactivity, but its mechanism is not clear. The present study was aimed to explore the mechanism of Radix Scrophulariae treatment of hyperthyroidism due to yin deficiency and fire hyperactivity. The urine metabolomic approach was conducted using the method of UPLC-TOF-MS. The results showed that Radix Scrophulariae has good therapeutic effects on hyperthyroidism rat model of yin deficiency. After treatment with Radix Scrophulariae, through metabolic profiling and protocol analysis, 6 potential metabolic markers may be closely related with the treatment mechanism of Radix Scrophulariae on this disease, including proline betaine, estrone, thymidine, 5-hydroxyindoleacetic acid, cyclic AMP and L-dopa. The strongest metabolic pathways were associated with tryptophan metabolism, pyrimidine metabolism, tyrosine metabolism, purine metabolism and steroid hormone biosynthesis. The urine metabolomic approach can be applied to clarify the therapeutic mechanism of Radix Scrophulariae on hyperthyroidism rat of

收稿日期: 2018-05-23; 修回日期: 2018-07-21.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2013CB531804); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81302898); 黑龙江省青年科学基金资助项目 (QC2012C038); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12541744); 黑龙江中医药大学科研基金资助项目 (B201104).

*通讯作者 Tel: 86-451-82193278, E-mail: keji-liu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0479

yin deficiency, and provide the theoretical basis for the clinical practice of Radix Scrophulariae on nourishing yin to reduce pathogenic fire.

Key words: Radix Scrophulariae; hyperthyroidism rat model of yin deficiency; nourishing yin to reduce pathogenic fire; metabonomics

中医学认为甲亢分为阴虚火旺型及非阴虚火旺型,其中火旺而阴虚是甲亢的主要病机特点。甲亢之火并非外来实火,而是内生虚火,所以不宜用苦寒清热法,否则火不能去,反而更盛。正如《素问·至真要大论》所云:“诸寒之而热者取之阴。”王冰言“壮水之主,以制阳光”。《静香楼医案》云:“阴不足者,阳必上亢而内燔。欲阳之降,必滋其阴,徒恃清凉无益也。”宜给予滋阴降火,则阴能生,阳火能降,阴阳回复平衡。玄参味甘苦咸,性寒质润,偏入阴分,以滋阴降火、解毒散结作用为主,对于热毒实火、阴虚内热等证均可应用。

课题组前期对纳入的 47 个专利中治疗甲亢的中药复方进行了统计分析,共涉及到了 168 味中药,玄参用药频率位居第 9 (31.91%)^[1]。以玄参为臣药的芪玄抑甲宁可能通过调节脑垂体轴来控制甲状腺激素的分泌以及调控 Th17 细胞的相关因子,治疗阴虚火旺甲亢大鼠^[2-6]。且课题组前期采用优甲乐对正常大鼠造成甲亢模型,分别从体征指标、基础代谢率及体内相关指标进行考察此甲亢模型具有一定的科学性^[7]。然而,单味中药玄参对阴虚火旺甲亢的作用机制尚不明确。

故本研究以优甲乐 (euthyrox, 左甲状腺素钠片) 所致的阴虚火旺甲亢模型为实验对象,从尿液代谢组学层面探讨了玄参提取物对阴虚火旺甲亢干预作用所涉及的相关代谢通路。期望能够明确玄参提取物治疗阴虚火旺甲亢的相关靶点及生物学基础,从而为玄参开发成作用靶标明确、安全有效治疗阴虚火旺甲亢的中药新药奠定基础。

材料与方

仪器 超液相色谱-飞行时间串联质谱仪 (美国 Waters 公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新有限公司); Milli-Q 超纯水系统 (Milli-Q 公司)。

药品和试剂 玄参饮片购自黑龙江省药材公司 (批号: 20120623012), 经黑龙江中医药大学中药资源与开发教研室王振月教授鉴定为玄参科植物玄参 (*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)。玄参提取物为课题组前期实验所得^[8], 保存于黑龙江中医药大学中

药性理论实验室; 优甲乐® euthyrox® 50 μg (左甲状腺素钠片, 批准文号: H20140052; 厂家: Merck KGaA); 亮氨酸脑啡肽 (L9133) (Sigma-Aldrich 公司); 色谱级甲醇 (Dikma 科技公司); 色谱级乙腈 (Dikma 科技公司)。

实验动物 雄性清洁级 SD 大鼠 30 只, 体重 180~220 g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (辽) 2015-0001。动物饲养于黑龙江中医药大学动物实验中心的代谢笼中, 室内温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h 避光, 12 h 光照, 自由饮食。经黑龙江中医药大学实验动物管理和使用委员会审核, 符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》和《实验动物使用和管理委员会章程》的相关规定, 实验动物伦理审查批准编号 DWLL20151108001。

动物分组、造模与给药方法 大鼠随机分为空白组、优甲乐诱导的阴虚火旺甲亢模型^[7,9]、玄参提取物治疗组, 每组 10 只。分别饲养于代谢笼中。空白组每天正常饲喂, 早上分别 i.g. 生理盐水, 两次, 间隔时间为 90 min; 模型组每天上午 i.g. 120 mg·kg⁻¹ 优甲乐混悬液 (给药质量浓度为 12 mg·mL⁻¹, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹), 90 min 后 i.g. 生理盐水, 每天一次, 连续 15 天; 玄参提取物组每天 i.g. 玄参提取物 1350 mg·kg⁻¹ (临床给药剂量折算而来, 给药质量浓度为 135 mg·mL⁻¹, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹)^[8], 其余处理与模型组相同。

样品采集与处理 分别于给药过程中的第 0、1、3、5、7、9、11、13 和 15 天各组分别收集 24 h 尿液。尿液样本于 12000 r·min⁻¹、4 °C, 离心 10 min 去除固体残渣, 将尿液上清液转移至 -80 °C 储存。检测前, 将冻融的尿液于 13000 r·min⁻¹、4 °C, 离心 10 min, 上清液转移至 1.5 mL 离心管, 然后用 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤, 上清液进行 UPLC-TOF-MS 检测。

代谢组学色谱与质谱条件

色谱条件: Waters Acquity SDS LCT Premier 色谱柱; 进样量 2.00 μL。柱温 40 °C, 样品温度 4.0 °C。流速为 0.4 mL·min⁻¹。流动相为 0.05% 甲酸-乙腈 (A) - 0.05% 甲酸-水 (B), 梯度洗脱, 0~8.00 min, 2.0%~40.0% A; 8.00~10.00 min, 40.0%~98.0% A; 10.00~

13.00 min, 98.0% ~ 100.0% A; 13.00 ~ 14.00 min, 100.0% ~ 2.0% A。

质谱条件: 正负离子模式, 毛细管电压正离子模式 1300.0 V, 负离子模式 1500.0 V; 样品锥孔电压正离子模式 60.0 V, 负离子模式 70.0 V; 脱溶剂气温度 350.0 °C; 源温度 110.0 °C; 锥孔气流量 20.0 L·h⁻¹; 脱溶剂气流量 750.0 L·h⁻¹; 离子能量正离子模式 35.0 V, 负离子模式 34.0 V; 质量扫描范围 *m/z* 100 to 1500 Da。

代谢组学数据处理与分析 在 Progenesis QI^[10] 软件上加载 LC-MS 运行, 在每个分析步骤中可视化原始数据。离子强度图显示保留时间、*m/z* 和特征强度以及质谱和色谱图的二维图, 为运行时自动校准、峰匹配和化合物去卷积提供质量保证。将 ANOVA $P < 0.05$ 和变量重要性投影 (VIP) 值 > 1 作为选择显著化合物的筛选条件, 过滤数据, 然后导入到 EZinfo 进行分析。通过无监督的主成分分析 (PCA) 来检查异常值和分类趋势, 并将数据可视化。再使用正交偏最小二乘 (OPLS-DA) 评估两组差异。S-plot 图中, 每个点代表准确的质量保留时间, *X* 轴代表变量, 离原点越远的数据点的相对贡献度越大, S-plot 图两端的点代表组间可信度最高的离子。将这些差异化合物重新导入到 Progenesis QI 软件中进行相关分析。

潜在代谢标志物鉴定及代谢通路分析 通过 HMDB、KEGG 等数据库进行化合物的分类鉴定, 最终用 cytoscape 3.4.0 软件将获得的化合物和通路的网络图进行可视化。

结果

1 尿液代谢谱分析

空白组、模型组、玄参提取物治疗组的尿液具有代表性的基峰强度 (BPI) 色谱图, 见图 1。由于 UPLC 色谱柱中的小颗粒填料, 小分子代谢物在短短的 13 min 内就能得到很好的分离。本研究发现, 健康大鼠与模型组大鼠的尿液代谢谱图存在明显差异, 表明模型组大鼠具有独特的尿液代谢物特征, 提示玄参的生物标志物不是单一物质的改变, 而是多种代谢物差异构成了尿液的生物标志物群。

2 大鼠经时轨迹变化

使用 PCA 法研究优甲乐诱导的阴虚火旺甲亢大鼠尿液代谢表型的经时轨迹变化, 模型组第 15 天的尿液代谢表型与第 0 天的最远, 说明优甲乐诱导的阴虚火旺甲亢的病理状态达到最高, 见图 2。使用 3D-PCA 法研究第 15 天优甲乐对正常大鼠的影响, 见图

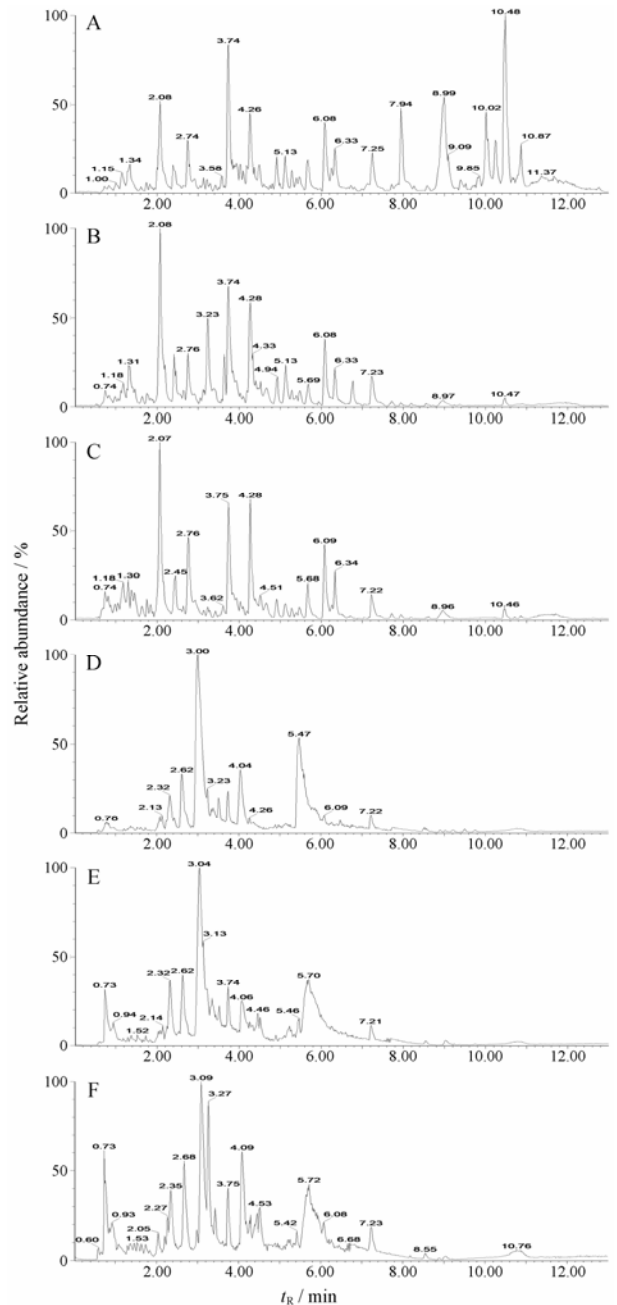


Figure 1 Based peak intensity chromatograms obtained from the positive ion and negative ion of rat urine. A, D: Control group; B, E: Model group; C, F: Radix Scrophulariae group

3A 和 B, 模型组样本点在 PC3 维与对照组可以完全区分开, 说明优甲乐模型组大鼠机体生理及物质代谢状况已经发生了明显的改变。而玄参提取物干预后, 玄参组样本点远离于模型组而向空白组接近, 表明玄参提取物干预后, 由优甲乐诱导产生的偏离得到了明显的改善 (图 3C 和 D)。

3 差异代谢物筛选和鉴定

本文使用 OPLS-DA 模型中 VIP 参数评价潜在的生物标志物, 结合 S-plot 及 VIP-plot 的结果, 见图 4,

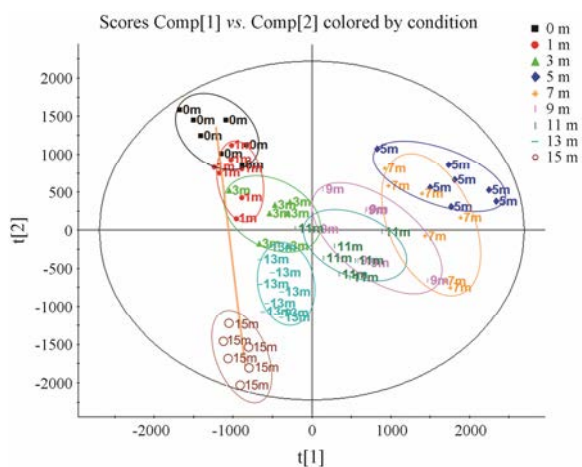


Figure 2 Trajectory change diagram of the urine metabolic phenotypes of rats at different time points following the administration of euthyrox. 0 m represents before administration; 1 m represents the first day after administration; 3 m represents the third day after administration; 5 m represents the fifth day after administration; 7 m represents the seventh day after administration; 9 m represents the ninth day after administration; 11 m represents the eleventh day after administration; 13 m represents the thirteenth day after administration; 15 m represents the fifteenth day after administration. The X axis is the score on the first principal component; The Y axis is the score on the second principal component

选取 VIP>1 的差异变量, 再用 *t* 检验对筛选到的差异变量在对照组和给药组间进行验证, 只有 $P < 0.05$ 的差异变量才被认为是潜在的生物标志物。

4 潜在代谢标志物及代谢路径分析

4.1 优甲乐诱导的阴虚火旺甲亢大鼠尿液代谢物及通路 在尿液中筛选得到 45 个具有显著差异的化合物, 通过比对这些潜在生物标志物的峰面积, 其中优甲乐对正常大鼠的尿液中潜在干预靶点中, 26 个上调, 19 个下调, 见表 1 和图 5。

将 45 个潜在生物标志物作为优甲乐对正常大鼠尿液中潜在生物标志物, 并进行 MetaPA 识别显著富集通路分析, 结果显示 45 个优甲乐扰动的尿液代谢物参与 18 个代谢通路, 见图 6, 分别是泛醌和其他萘醌类生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互作用、酪氨酸代谢、甘油磷脂代谢、尼古丁和烟酰胺代谢、色氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、嘧啶代谢、赖氨酸降解、类固醇激素生物合成、淀粉与蔗糖代谢、甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、嘌呤代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢和花生四烯酸代谢。

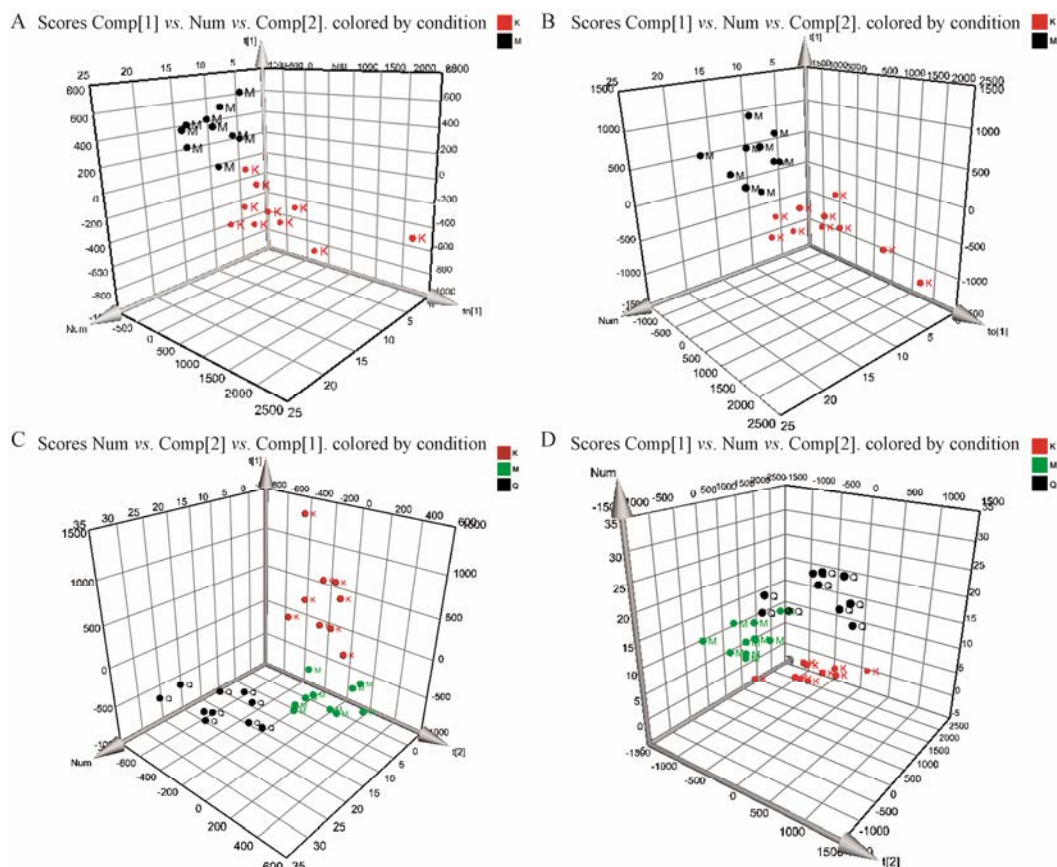


Figure 3 3D-PCA score plot among control group, model group and Radix Scrophulariae group. K represents control group, M represents model group; Q or g represents Radix Scrophulariae group. The X axis is the score on the first principal component; The Y axis is the score on the second principal component. A, C: Positive ion detection mode; B, D: Negative ion detection mode

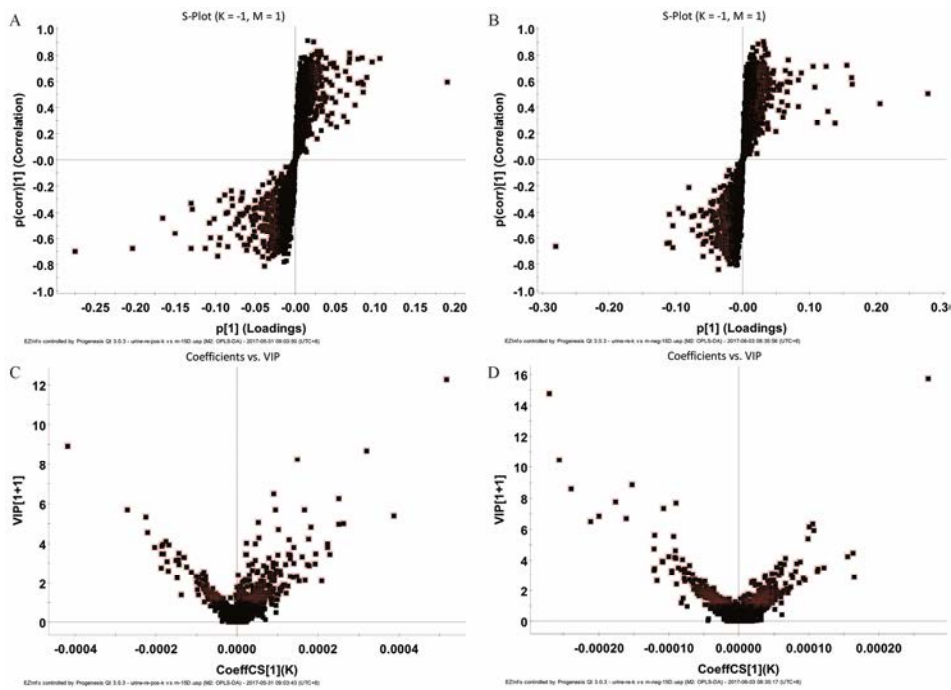


Figure 4 S (A, B) and VIP score plots (C, D) of euthyrox on normal rat urine samples in positive and negative ion mode

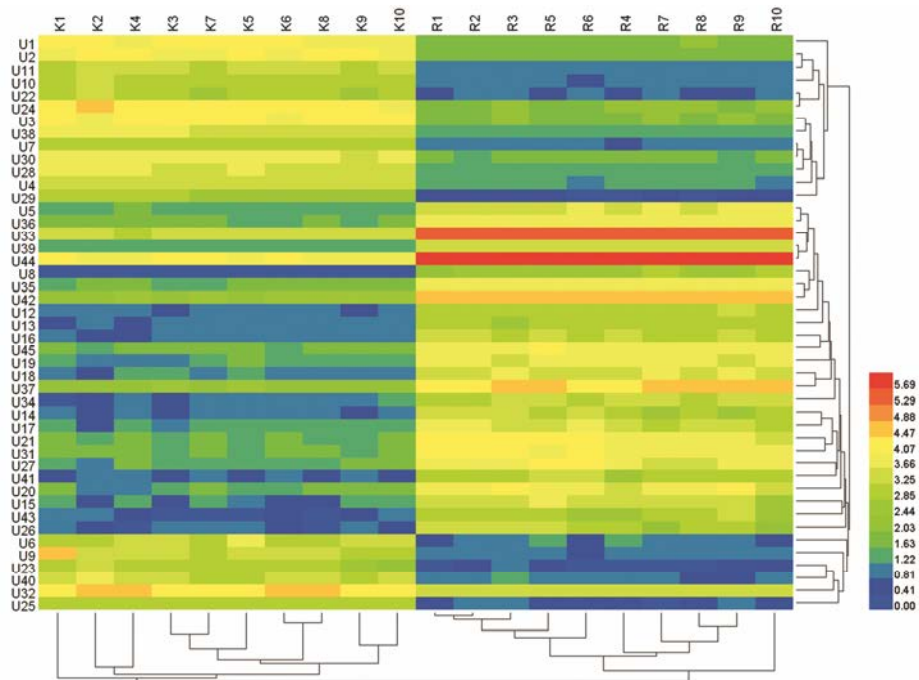


Figure 5 Heatmaps visualization for urine samples. Rows: Samples; columns: Metabolites. Color key indicates metabolite expression value, blue: Lowest; red: Highest. K represents control group; R represents model group; U represents urine.

4.2 玄参对阴虚火旺甲亢大鼠尿液标志物的调节作用 与阴虚火旺甲亢模型组相比, 玄参可显著回调的代谢物有 6 个 ($P < 0.05$), 其中上调的有 1 个、下调的有 5 个, 通过玄参对尿液中代谢物的调节作用, 干预阴虚火旺甲亢的发生, 见表 2 和图 7。基于 METPA 分析发现玄参可以显著回调的尿液中代谢标记物所涉及的代谢通路有 5 个, 分别是色氨酸代谢、嘧啶代

谢、酪氨酸代谢、嘌呤代谢和甾体激素类生物合成。

讨论

5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 参与了色氨酸代谢^[11]。五羟色胺 (5-HT) 的合成是色氨酸在色氨酸羟化酶作用下生成 5-羟色氨酸 (5-HTP), 又在 5-羟色胺酸脱羧酶催化下脱去羧基生成 5-HT。在单胺氧化酶作用

Table 1 Potential biomarkers in urine samples from hyperthyroidism rat model of yin deficiency induced by euthyrox. U represents urine. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs control group. †: Upregulation; ‡: Downregulation; HMDB ID represents HMDB number; Formula represents the molecular formula of markers; Metabolites represents the name of markers; KEGG represents the corresponding pathway number in KEGG

No.	<i>t_R</i> - <i>m/z</i>	HMDB ID	Ions mode	VIP	Formula	Metabolite	Trends (M/K)	Anova (p-value)	Max Fold Change	KEGG
U1	3.74_193.0754n	HMDB11723	Pos	3.433 4	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	2-Methylhippuric acid	↓*	0.026 8	1.470 8	C01586
U2	2.26_143.0952n	HMDB04827	Pos	3.433 4	C ₇ H ₁₃ NO ₂	Proline betaine	↓*	0.039 2	1.311 8	C10172
U3	4.06_202.1218n	HMDB00792	Pos	2.989 2	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	Sebacic acid	↓*	0.028 4	1.276 2	C08277
U4	2.83_183.0913n	HMDB00068	Pos	1.221 4	C ₉ H ₁₃ NO ₃	Epinephrine	↓*	0.036 7	1.218 9	C00788
U5	1.98_188.1067n	HMDB00784	Pos	1.454 6	C ₉ H ₁₆ O ₄	Azelaic acid	↑*	0.012 7	1.179 9	C08261
U6	6.77_475.2484 <i>m/z</i>	HMDB02004	Pos	1.551 3	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	5-Methoxydimethyltryptamine	↓*	0.034 2	1.747 1	C08309
U7	6.10_193.1242 <i>m/z</i>	HMDB00933	Pos	1.065 3	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	Traumatic acid	↓**	0.003 9	1.354 1	C16308
U8	10.46_190.0515 <i>m/z</i>	HMDB01553	Pos	1.533 9	C ₅ H ₈ O ₃ S	2-oxo-4-Methylthiobutanoic acid	↑**	0.000 2	8.574 7	C01180
U9	10.24_616.3478 <i>m/z</i>	HMDB02513	Pos	3.465 4	C ₃₀ H ₄₈ O ₉	Lithocholate 3- <i>O</i> -glucuronide	↓**	0.005 1	7.679 4	C03033
U10	0.87_226.0826 <i>m/z</i>	HMDB15122	Pos	1.144 6	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	Cytarabine	↓*	0.018 6	1.336 8	C02961
U11	2.95_192.0655 <i>m/z</i>	HMDB00735	Pos	1.211 1	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	Hydroxyphenylacetyl glycine	↓*	0.015 3	1.277 4	C05596
U12	1.92_275.1255 <i>m/z</i>	HMDB00273	Pos	1.664 7	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	Thymidine	↑**	0.000 1	1.757 6	C00214
U13	1.14_223.0225 <i>m/z</i>	HMDB00192	Pos	1.016 7	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	<i>L</i> -Cystine	↑*	0.015 8	1.364 7	C00491
U14	4.75_316.1794 <i>m/z</i>	HMDB00699	Pos	1.358 1	C ₇ H ₉ N ₂ O ⁺	1-Methylnicotinamide	↑*	0.047 8	1.724 4	C02918
U15	5.65_446.1934n	HMDB04483	Neg	1.596 9	C ₂₄ H ₃₀ O ₈	Estrone glucuronide	↑*	0.043 1	1.769 4	C11133
U16	2.29_218.1049n	HMDB01238	Neg	1.169 4	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	<i>N</i> -Acetylserotonin	↑**	0.006 6	1.534 1	C00978
U17	4.84_335.1689 <i>m/z</i>	HMDB06285	Neg	1.771 4	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	4-oxo-Retinoic acid	↑*	0.026 5	1.849 1	C16678
U18	1.23_298.9665 <i>m/z</i>	HMDB11719	Neg	2.073 4	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	Homovanillic acid sulfate	↑**	0.001 4	2.138 7	C05582
U19	4.52_403.1145 <i>m/z</i>	HMDB01892	Neg	2.737 2	C ₁₁ H ₈ O ₂	Menadione	↑**	0.000 3	2.068 1	C05377
U20	4.38_397.1475 <i>m/z</i>	HMDB02802	Neg	2.603 8	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	Cortisone	↑*	0.021 1	1.972 1	C00762
U21	4.28_449.1923 <i>m/z</i>	HMDB00764	Neg	3.168 9	C ₉ H ₁₀ O ₂	Hydrocinnamic acid	↑**	0.008 2	1.944 9	C05629
U22	10.75_563.3435 <i>m/z</i>	HMDB00759	Neg	1.004 8	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	Glycyl- <i>L</i> -leucine	↓**	0.004 8	1.659 6	C02155
U23	10.19_455.2456 <i>m/z</i>	HMDB10331	Neg	1.300 6	C ₂₂ H ₄₂ O ₇	Palmitoyl glucuronide	↓**	0.000 1	2.926 9	C03033
U24	10.06_796.5415 <i>m/z</i>	HMDB07911	Neg	3.557 5	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	PC(14:1(9Z)/20:0)	↓*	0.010 2	1.566 5	C00157
U25	9.15_315.1924 <i>m/z</i>	HMDB04238	Neg	1.214 1	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	delta-12-Prostaglandin J2	↓**	0.000 5	1.938 8	C05958
U26	5.65_519.2071 <i>m/z</i>	HMDB10351	Neg	1.161 8	C ₂₅ H ₃₈ O ₉	11-beta-Hydroxyandrosterone-3-glucuronide	↑*	0.047 3	2.177 4	C03033
U27	6.09_259.1306 <i>m/z</i>	HMDB13835	Neg	2.417 7	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Diisobutyl phthalate	↑**	0.008 3	1.872 2	C15205
U28	6.53_269.1869 <i>m/z</i>	HMDB00077	Neg	1.686 0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Dehydroepiandrosterone	↓**	0.005 2	1.425 9	C01227
U29	6.70_207.1137 <i>m/z</i>	HMDB00511	Neg	1.048 5	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Capric acid	↓**	0.002 9	2.433 2	C01571
U30	7.10_269.1532 <i>m/z</i>	HMDB00153	Neg	1.389 0	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	Estriol	↓*	0.046 2	1.226 9	C05141
U31	2.50_258.0564 <i>m/z</i>	HMDB00866	Neg	2.627 2	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	<i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -tyrosine	↑*	0.018 2	1.607 4	C01657
U32	2.41_216.9922 <i>m/z</i>	HMDB00707	Neg	3.166 7	C ₉ H ₈ O ₄	4-Hydroxyphenylpyruvic acid	↓*	0.033 3	1.295 8	C01179
U33	2.33_188.9952 <i>m/z</i>	HMDB00152	Neg	10.482 3	C ₇ H ₆ O ₄	Gentisic acid	↑**	0.008 7	1.214 3	C00628
U34	2.16_254.0798 <i>m/z</i>	HMDB00824	Neg	1.635 7	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	Propionylcarnitine	↑**	0.002 2	2.113 3	C03017
U35	2.04_350.1547 <i>m/z</i>	HMDB00128	Neg	1.706 8	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	Guanidoacetic acid	↑*	0.012 8	1.294 2	C00581
U36	1.32_234.0202 <i>m/z</i>	HMDB00181	Neg	1.948 3	C ₉ H ₁₁ NO ₄	<i>L</i> -Dopa	↑**	0.000 1	1.287 5	C00355
U37	1.73_219.0075 <i>m/z</i>	HMDB01866	Neg	4.110 5	C ₈ H ₈ O ₅	3,4-Dihydroxymandelic acid	↑*	0.014 0	1.445 4	C05580
U38	1.97_225.0995 <i>m/z</i>	HMDB01325	Neg	1.303 5	C ₉ H ₂ O ₂ N ₂	<i>N</i> ₆ , <i>N</i> ₆ , <i>N</i> ₆ -Trimethyl- <i>L</i> -lysine	↓*	0.014 5	1.256 2	C03793
U39	1.69_203.0126 <i>m/z</i>	HMDB00130	Neg	1.282 6	C ₈ H ₈ O ₄	Homogentisic acid	↑**	0.003 0	1.244 6	C00544
U40	2.55_208.0726 <i>m/z</i>	HMDB00014	Neg	1.856 4	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	Deoxycytidine	↓**	0.000 6	2.298 2	C00881
U41	3.89_281.0822 <i>m/z</i>	HMDB04230	Neg	1.281 4	C ₅ H ₅ NO ₂	Pyrrrole-2-carboxylic acid	↑**	0.003 2	2.297 1	C05942
U42	3.74_238.0835 <i>m/z</i>	HMDB00201	Neg	6.853 0	C ₉ H ₁₇ NO ₄	<i>L</i> -Acetylcarnitine	↑**	0.000 2	1.600 1	C02571
U43	3.65_226.0296 <i>m/z</i>	HMDB00763	Neg	1.069 8	C ₁₀ H ₉ NO ₃	5-Hydroxyindoleacetic acid	↑*	0.011 9	2.305 7	C05635
U44	3.07_212.0123 <i>m/z</i>	HMDB04073	Neg	14.780 2	C ₁₀ H ₉ NO ₂	5-Hydroxyindoleacetaldehyde	↑*	0.044 6	1.133 1	C05634
U45	3.38_364.0255 <i>m/z</i>	HMDB00058	Neg	2.642 4	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	Cyclic AMP	↑**	0.004 3	1.491 3	C00575

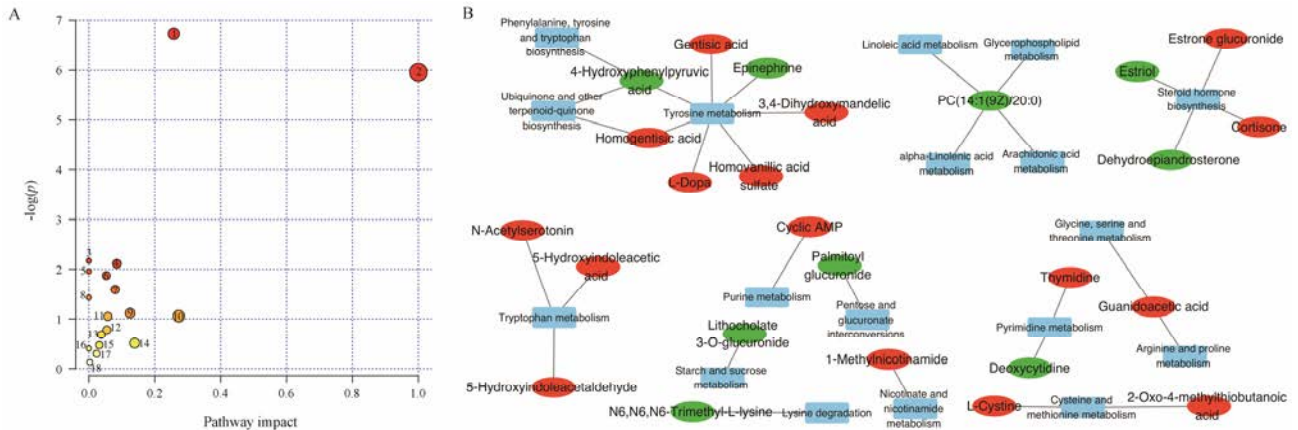


Figure 6 Topological graph of potential biomarkers in model group based on METPA (A) and pathway analysis of potential targets of euthyrox on normal rat (B). 1: Tyrosine metabolism; 2: Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; 3: Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 4: Tryptophan metabolism; 5: Linoleic acid metabolism; 6: Steroid hormone biosynthesis; 7: Cysteine and methionine metabolism; 8: alpha-Linolenic acid metabolism; 9: Nicotinate and nicotinamide metabolism; 10: Pentose and glucuronate interconversions; 11: Pyrimidine metabolism; 12: Lysine degradation; 13: Starch and sucrose metabolism; 14: Glycerophospholipid metabolism; 15: Glycine, serine and threonine metabolism; 16: Arachidonic acid metabolism; 17: Arginine and proline metabolism; 18: Purine metabolism. Blue rectangles represent pathway; red Ellipses represents metabolites (red: Upregulation; green: Downregulation)

Table 2 Biomarkers in the urine sample of hyperthyroidism rat model of yin deficiency induced by euthyrox

No.	t_R - m/z	HMDB ID	Ions mode	VIP	Formula	Metabolite	KEGG
U1	2.26_143.0952n	HMDB04827	Pos	3.955 77	$C_7H_{13}NO_2$	Proline betaine	C10172
U2	0.93_235.1496 m/z	HMDB00145	Pos	1.278 45	$C_{18}H_{22}O_2$	Estrone	C00468
U3	1.92_275.1255 m/z	HMDB00273	Pos	1.309 18	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	Thymidine	C00214
U4	3.65_226.0296 m/z	HMDB00763	Neg	1.318 96	$C_{10}H_9NO_3$	5-Hydroxyindoleacetic acid	C05635
U5	3.38_364.0255 m/z	HMDB00058	Neg	1.789 16	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	Cyclic AMP	C00575
U6	1.32_234.0202 m/z	HMDB00181	Neg	1.506 27	$C_9H_{11}NO_4$	L-Dopa	C00355

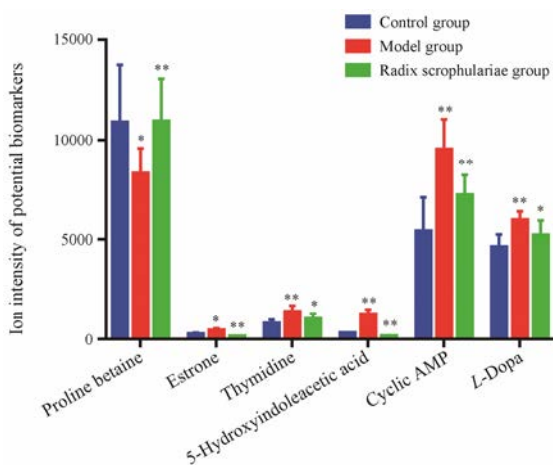


Figure 7 Ion intensity of potential biomarkers obtained from urine samples ($n=10$, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

下, 5-HT 降解为 5-HIAA。5-HIAA 是 5-HT 的主要代谢产物, 在尿液样本中, 5-HIAA 用于确定机体内 5-HT 水平, 不具有生物活性。在本研究中, 模型组中 5-HIAA 水平显著上调 ($P < 0.01$), 推测优甲乐促进了 5-HT 向 5-HIAA 的转化, 导致 5-HIAA 在尿液中含量

的增加, 报道指出肾功能异常和甲状腺功能亢进的患者有 5-HIAA 水平的改变^[12]。而玄参的干预显著下调 5-HIAA 的表达 ($P < 0.01$)。因此玄参可能间接抑制单胺氧化酶的活性, 抑制 5-HT 向 5-HIAA 的转化进而调节色氨酸代谢发挥滋阴降火作用。

胸苷 (脱氧胸苷, 脱氧胸腺嘧啶核苷) 是一种嘧啶脱氧核苷, 参与了嘧啶代谢。本研究中, 模型组尿液中胸苷水平显著上调 ($P < 0.01$), 据报道胸苷含量过高导致机体发热及神经系统症状^[13], 推测阴虚火旺性甲亢患者所出现的五心烦热、头痛目眩等症状可能是由于机体内胸苷高表达引起的, 而玄参显著下调尿液中胸苷水平 ($P < 0.05$), 因此玄参的治疗作用可能是通过调节嘧啶代谢中胸苷的水平来实现的。

左旋多巴 (L-dopa) 是儿茶酚胺类神经递质酶促合成过程的中间代谢产物, 也是多巴胺 (DA) 递质的前体物质, 由酪氨酸羟化酶催化左旋酪氨酸生成。DA 不能透过血脑屏障, 而左旋多巴是多巴胺的代谢前体, 能透过血脑屏障, 代谢为 DA^[14]。左旋多巴在体内代谢后, 大部分转变为 DA, 其主要代谢物为 3-甲

氧基-4-羟苯乙酸 (高香草酸, HVA) 和二羟苯乙酸 (DOPAC), 迅速经尿排泄^[15]。据报道左旋多巴在脑中转化成 DA 而发挥作用, 用于治疗原发性震颤麻痹及非药源性震颤麻痹综合征, 也用于治疗肝昏迷^[14], 而甲亢患者机体亦有震颤的表现^[16]。本研究模型组尿液中左旋多巴显著高表达 ($P < 0.01$), 而甲亢患者机体推测优甲乐抑制左旋多巴向 DA 的转化, 导致 DA 的机体内含量的减少而使得机体出现震颤。而玄参促进此转化的进行, 进而改善模型组的酪氨酸代谢。

环磷酸腺苷 (cAMP) 的功能是起第二信使的作用, 并具有广泛的生物学效应, 可影响许多酶的活性和细胞内的生理生化过程。例如蛋白质激酶、磷酸化酶、脂肪分解、胰岛素释放等, 均可被 cAMP 促进和加强, 而糖原合成酶、血小板凝集等又可被 cAMP 抑制^[17]。它不仅在神经系统中有重要的作用, 而且对行为和情绪有影响。例如, 将二丁基环-磷酸腺苷(为 cAMP 的衍生物), 埋藏于大鼠丘脑下部, 可引起发热、运动增多、激怒等现象^[18]。同一药品注入侧脑室也引起运动增多。有研究者^[19]观察到: 躁狂症患者尿中 cAMP 排出量较多, 抑郁症患者排出量较少, 躁狂-抑郁症患者由抑郁相转向躁狂相的当天, 尿中 cAMP 含量剧增。实验表明^[20]: 含氮激素的作用都是通过 cAMP 而完成的, 当此类激素到达某个可作用的细胞 (称为靶细胞) 时, 首先和该细胞膜上相应的受体结合, 结合一旦成功, 便激活细胞膜上的腺苷酸环化酶, 使得三磷酸腺苷转变为 cAMP; 细胞内 cAMP 浓度一改变, 便引起一系列化学反应。这些化学反应不仅执行了传递激素信息的功能, 而且还有一系列功能放大的作用。最后就使细胞产生明显的生理效应。本研究模型组尿液中 cAMP 高表达 ($P < 0.01$), 玄参显著下调模型组中 cAMP 水平 ($P < 0.01$), 推测, 玄参可能通过抑制 cAMP 的含量调节嘌呤代谢进而改善阴虚火旺甲亢大鼠烦躁易怒的状态。

雌酮为雌二醇的氧化产物, 雌酮的生物活性比雌二醇弱, 在患肝脏疾病、睾丸肿瘤、心肌梗塞等疾病时, 雌酮水平增高^[21, 22]。本研究模型组尿液中雌酮高表达 ($P < 0.05$), 且临床上报道甲状腺机能亢进患者的雌激素水平高于正常健康者激素水平, 雌激素水平与甲亢有相关性, 雌激素对甲状腺机能的发生、发展有促进作用^[23]。故推测优甲乐导致机体发生器质性病变, 而玄参治疗后显著下调雌酮水平 ($P < 0.01$), 因此, 玄参可能通过调节类固醇激素的合成途径中雌酮的水平间接调节雌激素水平来发挥治疗作用。

本研究发现了 6 个潜在生物标志物, 分别为脯氨

酸二甲内盐、雌酮、胸苷、5-羟吲哚乙酸、环磷酸腺苷和左旋多巴, 相关性最强的通路有色氨酸代谢、嘧啶代谢、酪氨酸代谢、嘌呤代谢和甾体激素类生物合成。值得注意的是玄参提取物对脯氨酸二甲内盐的下调和雌酮、胸苷、5-羟吲哚乙酸、环磷酸腺苷和左旋多巴的上调均具有显著的逆转趋势, 能够使得它们的表达恢复平衡。这些结果可能表明了玄参提取物对优甲乐诱导的阴虚火旺甲亢的防治作用, 可以通过尿液中多个代谢物靶点的干预来实现。鉴别出尿液中 6 个潜在生物标志物参与了阴虚火旺甲亢相关的代谢通路, 而玄参提取物对尿液中相关靶点具有干预作用, 从而找到玄参防治阴虚火旺甲亢的生物学基础。

References

- [1] Liu C, Liu H, Miao J, et al. Discussion on the law of traditional Chinese medicine for treating hyperthyroidism in the national patents [J]. *Inf Tradit Chin Med (中医药信息)*, 2013, 52: 61–64.
- [2] Liu S, Cui X, Chen P, et al. A comparative study of two hyperthyroidism models induced by *Yersinia enterocolitica* and Euthyrox [J]. *Chin J Comp Med (中国比较医学杂志)*, 2014, 24: 19–24, 3.
- [3] Liu S, Zhen Z, Wang K, et al. Pharmacodynamic research of QixuanYijianing in the treatment of hyperthyroidism [J]. *Acta Chin Med Pharmacol (中医学报)*, 2017, 45: 48–51.
- [4] Liu S, Zhen Z, Zhang N, et al. Research progress of animal models of graves disease [J]. *J Liaoning Univ TCM (辽宁中医药大学学报)*, 2016, 18: 8–11.
- [5] Liu S, Zhen Z, Li J, et al. Regulatory effect of QixuanYijianing on Th17 cells of rats with hyperthyroidism [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2017, 33: 144–148.
- [6] Liu S, Cui X, Feng G, et al. Supplementing Qi and nourishing Yin prescription in treatment of hyperthyroidism [J]. *J Liaoning Univ TCM (辽宁中医药大学学报)*, 2014, 16: 5–7.
- [7] Xiao H, Tan C, Dou D. Effects of 3 Chinese drugs with cold property on hyperthyroidism rats induced by euthyrox [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2016, 34: 2122–2125.
- [8] Zhang N, Li Z, Liu G, et al. Antidiabetic activity of *Radix Scrophulariae* and its split fraction [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2016, 32: 55–60.
- [9] Zhao H, Zhang N, Pang M, et al. The effect of *Radix Scrophulariae* and split components on material and energy metabolism in pyretic syndrome rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2017, 33: 93–96.

- [10] Lin L, Lin H, Zhang M, et al. A novel method to analyze hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Hazard Mater*, 2015, 299: 249–259.
- [11] Myint AM, Bondy B, Baghai TC, et al. Tryptophan metabolism and immunogenetics in major depression: a role for interferon-gamma gene [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 128–33.
- [12] Li Y, Mu S, Tang A. Progress in the study of 5-hydroxyindolyl acetic acid [J]. *Pract Prev Med (实用预防医学)*, 2010, 17: 2131–2134.
- [13] Karbownik M, Modrzejewska H, Gesing A, et al. Thymidine kinase activity in homogenates of rat thyroid lobes from euthyroid, hypothyroid and/or hyperthyroid rats incubated with EGF: studies *ex vivo in vitro* [J]. *Endocr Regul*, 1999, 33: 17–23.
- [14] Porras G, De Deurwaerdere P, Li Q, et al. *L*-Dopa-induced dyskinesia: beyond an excessive dopamine tone in the striatum [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3730.
- [15] Huang L, Deng M, Zhang S, et al. Coadministration of beta-asarone and levodopa increases dopamine in rat brain by accelerating transformation of levodopa: a different mechanism from Madopar [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41: 685–690.
- [16] Mazzucchi S, Frosini D, Calabrese R, et al. Symptomatic orthostatic tremor associated with Graves' disease [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35: 929–931.
- [17] Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA [J]. *Science*, 2013, 339: 826–830.
- [18] Macdonald LJ, Graham JG, Kurten RC, et al. *Coxiella burnetii* exploits host cAMP-dependent protein kinase signalling to promote macrophage survival [J]. *Cell Microbiol*, 2014, 16: 146–159.
- [19] Kim MH, Leem YH. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus [J]. *J Exerc Nutr Biochem*, 2014, 18: 97–104.
- [20] Paramonov VM, Mamaeva V, Sahlgren C, et al. Genetically-encoded tools for cAMP probing and modulation in living systems [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2015, 6: 196.
- [21] Lauro FV, Francisco DC, Elodia GC, et al. Evaluation of activity of an estrogen-derivative as cardioprotector drug using an ischemia-reperfusion injury model [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 12041–12055.
- [22] Sinclair M, Gow PJ, Angus PW, et al. High circulating oestrone and low testosterone correlate with adverse clinical outcomes in men with advanced liver disease [J]. *Liver Int*, 2016, 36: 1619–1627.
- [23] Olivo J, Gordon GG, Rafii F, et al. Estrogen metabolism in hyperthyroidism and in cirrhosis of the liver [J]. *Steroids*, 1975, 26: 47–56.