

# 山西老陈醋对大鼠机体影响的代谢组学研究

李爱平<sup>1,2</sup>, 范玛莉<sup>1,2</sup>, 张松<sup>3</sup>, 秦雪梅<sup>1</sup>, 杜冠华<sup>4</sup>, 李震宇<sup>1,\*</sup>

(1.山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 2.山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006; 3.山西省分析科学研究院核磁共振检测研究室, 山西 太原 030006; 4.中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:**采用基于核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H NMR)的代谢组学技术,结合代谢通路分析,对山西老陈醋对大鼠机体代谢组学的影响进行研究。结果表明:给予山西老陈醋后,大鼠的血清和尿液内源性代谢物发生明显变化,其中 $\alpha$ -葡萄糖、 $\beta$ -葡萄糖、乳酸、柠檬酸、苹果酸、脂质和马尿酸等代谢物含量变化较大。代谢通路分析发现,山西老陈醋能显著影响大鼠机体的酮体合成与降解、淀粉和蔗糖代谢以及三羧酸循环和丁酸甲酯代谢,这些影响主要与能量代谢、糖代谢、脂肪代谢等过程密切相关。本研究从代谢组学的角度分析了山西老陈醋对大鼠正常机体代谢物的影响,为其抗疲劳、降糖、降脂等保健作用提供了研究依据。

**关键词:**山西老陈醋; 代谢组学; 核磁共振氢谱; 多元统计分析; 代谢通路分析

## Metabolomic Study of the Effect of Shanxi Aged Vinegar on Rats

LI Aiping<sup>1,2</sup>, FAN Mali<sup>1,2</sup>, ZHANG Song<sup>3</sup>, QIN Xuemei<sup>1</sup>, DU Guanhua<sup>4</sup>, LI Zhenyu<sup>1,\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Nuclear Magnetic Resonance Detecting Laboratory, Shanxi Academy of Analytical Sciences, Taiyuan 030006, China; 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic approach combined with metabolomics pathway analysis (MetPA), the metabolic influence of Shanxi aged vinegar (SAV) on rats was carried out. The results indicated that metabolomic profiles of SAV-treated rats differed greatly from those of normal controls, with a significant change observed in  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose, lactate, citrate, malic acid, lipid, and hippurate. Four pathways including synthesis and degradation of ketone bodies and metabolism of starch, sucrose, citrate cycle and methyl butyrate were regarded as the targeted metabolic pathways according to MetPA. The results suggested that the metabolic alteration induced by Shanxi aged vinegar in rats was mainly involved in energy metabolism, glucose metabolism and lipid pathways. This study revealed the effect of Shanxi aged vinegar on metabolomic profiles of rats in a holistic way, which can lay the foundation for assessing anti-fatigue, hypoglycemic and hypolipidemic functions of Shanxi aged vinegar.

**Key words:** Shanxi aged vinegar; metabolomics; <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance; multivariate statistical analysis; metabolomics pathway analysis

中图分类号: TS26

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 23-0268-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201523049

食醋作为一种常用的食品调味品,不仅含有丰富的营养成分,还具有独特的营养功效。现代研究表明,食醋的营养功能主要取决于其含有的各种有机酸(主要是醋酸与乳酸)、还原糖、氨基酸以及微量元素<sup>[1]</sup>。而食醋用于人类防病治病也具有悠久的历史,自古我国就有“醋能治百病”之说,古医书中有“醋酸温,开胃养肝,强筋暖骨,醒酒消食,下气辟邪,解鱼蟹鳞介诸

毒,陈久而味厚气香者良”的记载,《本草纲目》中有“醋能消肿、散火气、杀邪毒、理诸药”的记载。现代研究表明食醋有降血压、降血脂、调节血糖、抗疲劳、减肥和促进食欲等多种功能<sup>[2-5]</sup>。山西老陈醋有着3 000多年的历史,以“绵、酸、香、甜、醇”的独特风味和营养价值倍受国内外消费者青睐,有“天下第一醋”的美誉<sup>[6]</sup>。山西老陈醋的功能性成分十分丰富,对人体有多种

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 山西省农业科技攻关计划项目(20140311023-4); 山西省高等学校创新人才支持计划项目

作者简介: 李爱平(1988—),女,硕士研究生,主要从事食品及中药代谢组学研究。E-mail: liapsxu@163.com

\*通信作者: 李震宇(1980—),男,副教授,博士,主要从事食品及中药代谢组学研究。E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

生理作用和生物学活性,可用于人体的保健与养生,如运动员专用醋<sup>[7]</sup>。

代谢组学是一门定量研究生物体的代谢组成以及由于内源性因素(如生理和发育状况)和外源性因素(如环境和外源性物质)所引起的生物体代谢物动态变化的学科,能实时反映生理调控过程的终点,所获得的信息与生物表型或整体状况的距离最近,是生物学现象的最终表现<sup>[8]</sup>,具有整体性、系统性、动态性的特点,目前已广泛应用于营养学研究领域<sup>[9-10]</sup>,如对普洱茶<sup>[11]</sup>、葡萄酒<sup>[12]</sup>、红茶与绿茶<sup>[13]</sup>的研究等。山西老陈醋成分复杂,对机体的代谢影响涉及多种成分、靶点和途径,而常规方法难以对山西老陈醋的营养机制进行科学评价。因此,采用代谢组学技术将有助于从整体上阐明山西老陈醋这一复杂化学系统对生物体所产生的整体影响。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术作为代谢组学的主要研究手段之一,具有对检测的对象无偏向性、样品前处理简单、对样品进行非破坏性检测的优点。因此,本研究拟采用基于核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)的代谢组学技术结合模式识别分析方法,全面系统地研究山西老陈醋对机体的宏观代谢影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、动物与试剂

食醋由山西水塔老陈醋股份有限公司提供,为水塔老陈醋八年陈酿,批号为20121220。

SPF级雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠,体质量180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2013-0001。动物饲养室保持温度(23.0±1.5)℃,相对湿度(45±15)%,自然昼夜节律光照,适应性饲养大鼠1周后进行实验。

NMR试剂重水(D<sub>2</sub>O) 美国Norell公司; 2,2,3,3-*d*(4)-3-(三甲基甲硅烷基)丙酸钠盐(2,2,3,3-*d*(4)-3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt, TSP) 美国CIL公司。

### 1.2 仪器与设备

Bruker 600-MHz Avance III NMR仪(600.13 MHz质子频率) 德国布鲁克公司; TGL-16高速台式冷冻离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 山西老陈醋的NMR分析

取食醋样品30 mL,用1 mol/L NaOH溶液调pH值至7.0后,冷冻干燥。取冻干粉65 mg,加入含0.05% TSP的

D<sub>2</sub>O溶液800 μL溶解,离心10 min,取600 μL转移到5 mm标准核磁管中待测。样品于600 MHz NMR仪(25℃)上测定,采用NOESYGPPR1d脉冲序列,扫描次数为64,谱宽12 345.7 Hz,脉冲时间14 μs,采样时间2.654 s,延迟时间1.0 s,采样数据点65 536, FID分辨率0.188 Hz,采样间隔40.5 μs,内标为TSP。

#### 1.3.2 动物实验

14只雄性SD大鼠随机分为空白组、给醋组,每组7只。给醋组(Cu组)灌胃给予食醋1 mL/(kg·d),空白组(Con组)给予等量的蒸馏水,分笼饲养;21 d后用代谢笼收集大鼠尿液,并进行股动脉取血,3 500 r/min离心15 min,取上清液,移至EP管中,置于-80℃冰箱中贮存,备用。

#### 1.3.3 大鼠血清、尿液NMR备样及测定条件

将大鼠血清、尿液样品在冰水中解冻,精密吸取350 μL血清置于EP管中,加入450 μL D<sub>2</sub>O,涡旋30 s,于4℃、13 000 r/min离心15 min,取上清液600 μL转移至5 mm核磁管中待测;精密吸取尿液500 μL置于EP管中,加入200 μL含0.1% TSP的磷酸盐缓冲液(含D<sub>2</sub>O, 0.1 mol/L、pH 7.4),涡旋30 s,于4℃、13 000 r/min离心15 min,取600 μL上清液转移至5 mm核磁管中待测。

样品在600 MHz NMR仪上测定,测定频率为600.13 MHz,扫描次数为64,血清样品采用Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)脉冲序列,以衰减蛋白质和脂蛋白的宽峰,具体参数为:谱宽12 019.2 Hz,脉冲时间14 μs,采样时间2.726 3 s,弛豫时间1.0 s,采样数据点65 536, FID分辨率0.188 Hz,采样间隔40.5 μs;尿液样品采用NOESYPPR1d序列压制残余水信号,具体参数为:谱宽12 345.7 Hz,脉冲时间14 μs,采样时间2.654 2 s,弛豫时间1.0 s,采样数据点65 536, FID分辨率0.188 Hz,采样间隔40.5 μs。

#### 1.3.4 <sup>1</sup>H NMR图谱处理

NMR图谱采用MestReNova 8.0.1软件进行处理。所有光谱进行手动相位、基线调整。血清NMR图谱中,以肌酐的化学位移δ 3.04为标准进行化学位移校正,以δ 0.01对化学位移区间δ 0.80~8.50进行分段积分,其中δ 4.67~5.20(残余水峰)不进行积分,并将积分数据进行归一化,导入Excel中进行下一步多元统计分析;尿液NMR图谱以TSP的化学位移δ 0.00为标准进行定标,δ 0.04步长对化学位移区间δ 0.60~9.60进行分段积分,其中δ 4.60~6.20(残余水峰与尿素峰)不进行积分,将数据归一化后,导入Excel中进行下一步多元统计分析。

1.4 数据统计分析

将上述处理的积分数据导入SIMCA-P 13.0软件中进行主成分分析（principal component analysis, PCA），再用偏最小二乘判别分析法（partial least squares discriminant analysis, PLS-DA）和正交偏最小二乘判别分析法分析（orthogonal PLS-DA, OPLS-DA）找出样品间的差异代谢产物，并用SPSS 16.0软件对差异成分进行 *t*-检验分析。

2 结果与分析

2.1 山西老陈醋化学成分分析

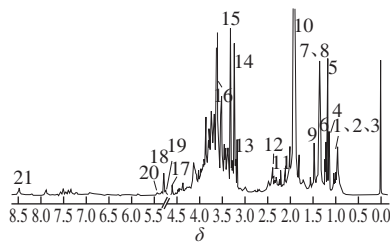


图1 山西老陈醋的<sup>1</sup>H NMR图谱

Fig.1 Typical <sup>1</sup>H NMR spectrum of Shanxi aged vinegar

表1 山西老陈醋的<sup>1</sup>H NMR数据解析  
Table 1 <sup>1</sup>H NMR assignments of major metabolites from Shanxi aged vinegar

序号	代谢物	$\delta^1\text{H}$ (多重性)	相对峰面积
1	亮氨酸	0.95 (t, 7.2)	—
2	异亮氨酸	0.96 (t, 6.6)、 1.01 (d, 7.2)	0.28
3	缬氨酸	0.99 (d, 7.2)、 1.05 (d, 7.8)	0.33
4	3-羟基丁酸	1.15 (d, 6.0)	1.08
5	乙醇	1.19 (t, 7.2)	1.81
6	乙酸乙酯	1.23 (t, 7.2)	0.95
7	苏氨酸	1.35 (d, 7.2)	—
8	乳酸	1.39 (d, 7.2)、 4.43 (q, 6.6)	—
9	丙氨酸	1.48 (d, 7.2)	0.94
10	乙酸	1.92 (s)	46.97
11	丙酮酸	2.23 (s)	0.23
12	琥珀酸	2.41 (s)	0.29
13	胆碱	3.20 (s)	0.53
14	甜菜碱	3.27 (s)	1.33
15	肌醇	3.36 (s)	2.65
16	甘油	3.55 (dd, 4.2, 9.6)、 3.66 (dd, 4.2, 11.4)	2.52
17	$\beta$ -葡萄糖	4.66 (d, 7.8)	0.15
18	$\alpha$ -葡萄糖	5.24 (d, 3.6)	0.36
19	乳糖	5.19 (d, 3.6)	0.06
20	蔗糖	5.41 (d, 3.6)	0.06
21	甲酸	8.46 (s)	0.19

注：相对峰面积的计算以TSP为内标；— 未检出或低于检测限。

本研究采用山西老陈醋进行动物实验，首先采用<sup>1</sup>H NMR技术对其进行化学成分分析，通过化学位移、耦合常数、峰型等NMR数据，结合标准品以及本课题组前期研究，从山西老陈醋中鉴定了21个化合物，包括有机酸、氨基酸、糖类成分（图1）。NMR图谱的积分面积可以反映物质的相对含量，因此以TSP为内标，计算这些成分在食醋中的相对含量，具体含量见表1。

2.2 大鼠血清与尿液化学成分NMR分析

通过化学位移、耦合常数及峰型等NMR数据分析，结合标准品、数据库HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://bmrb.wisc.edu/>)和文献[14-16]数据对照，从大鼠血清NMR图谱（图2A）中辨认出了32种化合物，尿液NMR图谱（图2B）中辨认出了23种化合物，包括氨基酸、有机酸、糖类等。具体化学位移归属见表2。

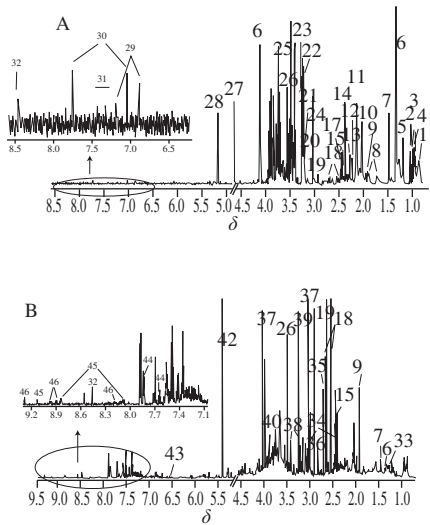


图2 大鼠血清(A)与尿液(B)的<sup>1</sup>H NMR图谱

Fig.2 Typical <sup>1</sup>H NMR spectra of rat serum (A) and urine (B)

表2 大鼠血清与尿液的<sup>1</sup>H NMR数据解析  
Table 2 <sup>1</sup>H NMR assignments of major metabolites from rat serum and urine

序号	代谢物	$\delta^1\text{H}$	序号	代谢物	$\delta^1\text{H}$
1	脂质 <sup>S</sup>	0.87 (m) <sup>A</sup> 、1.28 (m)、 5.30 (m)	24	肌酐 <sup>S</sup>	3.04 (s)、3.94 (s)
2	缬氨酸 <sup>S</sup>	0.99 (d)、1.05 (d)	25	甘油酯 <sup>S</sup>	3.66 (dd)、3.57 (dd)
3	异亮氨酸 <sup>S</sup>	0.94 (t)、1.02 (d)、 1.27 (m)	26	甘氨酸 <sup>UI</sup>	3.56 (s)
4	亮氨酸 <sup>S</sup>	0.96 (d)、0.97 (d)	27	$\alpha$ -葡萄糖 <sup>S</sup>	4.65 (d)
5	3-HB <sup>S</sup>	1.20 (d)、2.41 (d)、 2.31 (d)	28	$\beta$ -葡萄糖 <sup>S</sup>	5.23 (d)
6	乳酸 <sup>UI</sup>	1.33 (d)、4.12 (q)	29	酪氨酸 <sup>S</sup>	6.89 (d)、7.18 (d)
7	丙氨酸 <sup>UI</sup>	1.48 (d)	30	组氨酸 <sup>S</sup>	7.75 (s)、7.05 (s)
8	赖氨酸 <sup>S</sup>	1.89 (m)、1.73 (m)、 1.44 (m)	31	苯丙氨酸 <sup>S</sup>	7.32 (m)、7.42 (m)
9	乙酸 <sup>UI</sup>	1.92 (s)	32	甲酸 <sup>UI</sup>	8.46 (s)
10	N-乙酰化糖蛋白 <sup>S</sup>	2.05 (s)	33	甲基丙二酸 <sup>UI</sup>	1.25 (d)、3.81 (q)

续表2

序号	代谢物	$\delta^1\text{H}$	序号	代谢物	$\delta^1\text{H}$
11	O-乙酰乙酰糖蛋白 <sup>S</sup>	2.15 (s)	34	$\alpha$ -酮戊二酸 <sup>U</sup>	2.44 (t), 3.01 (t)
12	丙酮 <sup>S</sup>	2.23 (s)	35	二甲胺 <sup>U</sup>	2.72 (s)
13	乙酰乙酸 <sup>S</sup>	2.28 (s)	36	甲基胍 <sup>U</sup>	2.84 (s)
14	丙酮酸 <sup>U</sup>	2.37 (s)	37	肌酸酐 <sup>U</sup>	3.04 (s), 4.06 (s)
15	琥珀酸 <sup>U</sup>	2.41 (s)	38	牛磺酸 <sup>U</sup>	3.23 (t), 3.42 (t)
16	谷氨酸 <sup>S</sup>	2.06 (m), 2.35 (m)	39	甜菜碱 <sup>U</sup>	3.27 (s), 3.90 (s)
17	谷氨酰胺 <sup>S</sup>	2.14 (m), 2.46 (m)	40	胍乙酸盐 <sup>U</sup>	3.80 (s)
18	柠檬酸 <sup>U</sup>	2.53 (d), 2.70 (d)	41	苹果酸 <sup>U</sup>	4.31 (dd), 2.62 (dd), 2.36 (dd)
19	二甲胺 <sup>U</sup>	2.93 (s), 3.72 (s)	42	尿囊素 <sup>U</sup>	5.38 (s)
20	胆碱 <sup>S</sup>	3.20 (s)	43	富马酸 <sup>U</sup>	6.53 (s)
21	PC <sup>S</sup>	3.22 (s)	44	马尿酸 <sup>U</sup>	3.96 (d), 7.64 (t), 7.52 (t), 7.83 (d)
22	GPC <sup>S</sup>	3.23 (s)	45	葫芦巴碱 <sup>U</sup>	9.13 (s), 8.84 (dd), 8.08 (d), 4.44 (s)
23	TMAO <sup>S</sup>	3.27 (s)	46	N-甲基烟酰胺 <sup>U</sup>	9.28 (s), 8.96 (d), 8.91 (d), 8.19 (m), 4.48 (s)

注: S. 血清; U. 尿液; a. 多重性; 3-HB. 3-羟基丁酸 (3-hydroxybutyrate); PC. 磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine); GPC. 甘油磷酸胆碱 (glycerophosphorylcholine); TMAO. 氧化三甲胺 (trimethylamine oxide)。下同。

### 2.3 大鼠血清与尿液化学成分多元统计分析

在无监督的模式识别方法PCA分析中, 由前两个主成分 (PC 1: 34.4%、PC 2: 31.9%) 为坐标轴构建的得分散点图 (图3) 可以看出, 空白组与给醋组的血清样本能够分开, 说明食醋对大鼠机体的血清内源性代谢物有影响。但是PCA分析只能反映数据的原始状态以及实验样品的自然分布和组别关系, 不能忽略组内误差, 消除与研究目的无关的随机误差, 不利于组间差异的分析和差异代谢物的寻找。为了确定空白组与给醋组之间的差异内源性代谢物, 本研究采用有监督的模式识别OPLS-DA分析对数据进行进一步分析。

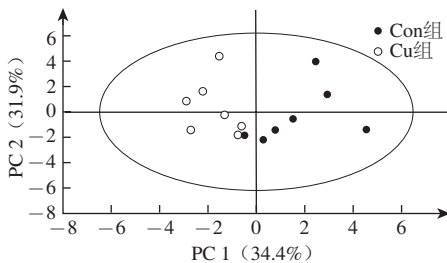


图3 大鼠血清化学成分PCA分析  
Fig.3 PCA analysis of the chemical composition of rat serum

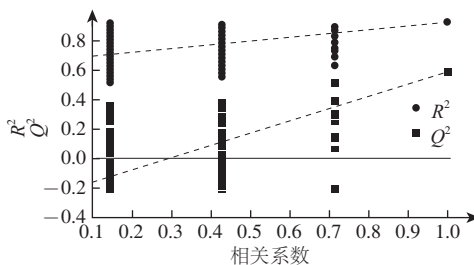
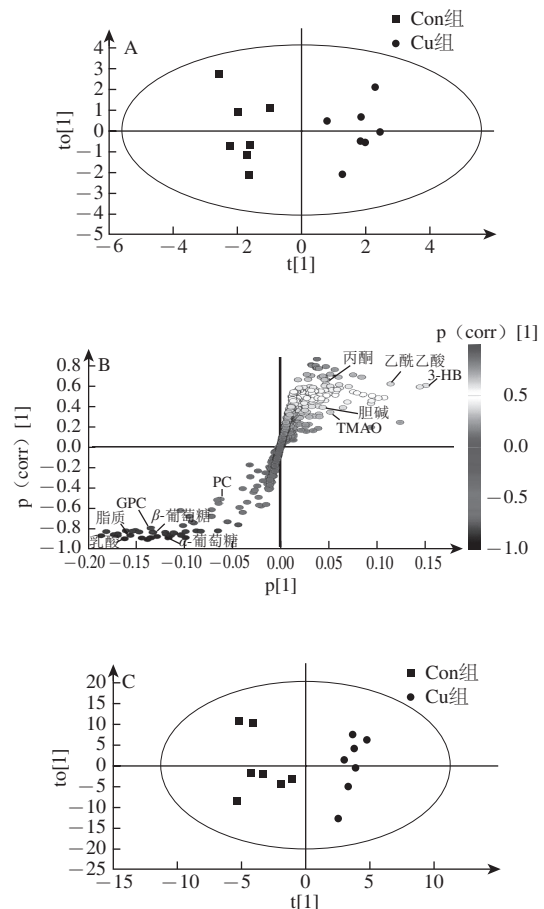
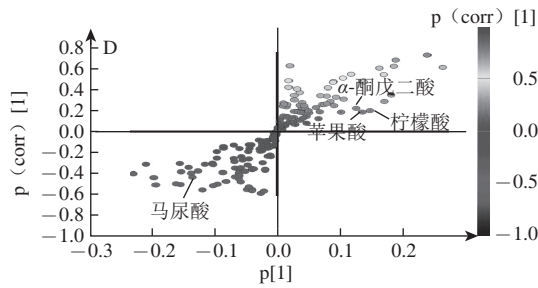


图4 大鼠血清排列实验模型验证图  
Fig.4 Validation plot by permutation test

先用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性。如图4所示, 在排列实验中, 左端任何一次随机排列产生的 $R^2$ 、 $Q^2$ 均小于右端,  $Q^2$ 的回归线与纵轴相交并处于零点以下, 且两条回归线斜率较大, 最右端的两个点距离较小, 说明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列y变量的预测能力, 即证明了模型有效, 可以继续后面差异代谢物的寻找<sup>[17]</sup>。通过模型验证, 采用有监督的模式识别OPLS-DA方法进行分析, 如图5A所示, 空白组与给醋组的血清样本明显分开, 组间差异变大, 组内差异减小。通过S-plot图 (图5B) 和变量重要性投影值 (variable importance on projection, VIP) (大于1) 相结合分析确定, 给醋组大鼠血清中3-HB、乙酰乙酸、丙酮、胆碱、TMAO含量上升, 而脂质、乳酸、PC、GPC、 $\alpha$ -葡萄糖、 $\beta$ -葡萄糖含量下降。采用相同的方法对大鼠尿液进行分析, OPLS-DA得分图见图5C, S-plot图 (图5D) 和VIP值 (大于1) 相结合分析确定, 给醋组大鼠尿液中柠檬酸、苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸含量上升, 而马尿酸含量下降。对上述差异成分采用SPSS 16.0软件进行t-检验分析, 由表3可知, 代谢差异物单变量分析结果趋势与多元统计分析基本一致。







A、B. 大鼠血清化学成分OPLS-DA得分散点图与S-plot图；  
C、D. 大鼠尿液化学成分OPLS-DA得分散点图与S-plot图。

图5 大鼠血清与尿液化学成分多元统计分析

Fig.5 Multiple statistical analysis of the chemical composition of rat serum and urine

表3 空白组、给醋组大鼠血清代谢差异物积分面积单变量分析 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 3 Comparison of integral levels of metabolites between control and SAV treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

序号	代谢物	$\delta$	Con组	Cu组
1	脂质 <sup>S</sup>	1.28	0.527±0.064	0.458±0.041
2	3-HB <sup>S</sup>	1.20	0.447±0.072	0.739±0.071 <sup>a</sup>
3	乳酸 <sup>S</sup>	1.33	5.387±0.427	5.110±0.387
4	乙酰乙酸 <sup>S</sup>	2.28	0.234±0.033	0.391±0.044 <sup>*</sup>
5	丙酮 <sup>S</sup>	2.23	0.206±0.017	0.281±0.014 <sup>**</sup>
6	胆碱 <sup>S</sup>	3.20	0.410±0.017	0.444±0.017
7	PC <sup>S</sup>	3.22	0.668±0.018	0.613±0.018 <sup>*</sup>
8	GPC <sup>S</sup>	3.23	1.185±0.026	1.030±0.026 <sup>**</sup>
9	TMAO <sup>S</sup>	3.27	0.376±0.035	0.449±0.023
10	α-葡萄糖 <sup>S</sup>	4.65	0.575±0.019	0.450±0.014 <sup>**</sup>
11	β-葡萄糖 <sup>S</sup>	5.23	0.670±0.026	0.526±0.016 <sup>**</sup>
12	柠檬酸 <sup>U</sup>	2.53	2.989±0.458	3.142±0.343
13	苹果酸 <sup>U</sup>	2.62	0.995±0.041	1.101±0.038
14	α-酮戊二酸 <sup>U</sup>	2.44	2.125±0.237	2.207±0.252
15	马尿酸 <sup>U</sup>	7.83	0.194±0.058	0.142±0.035

注: \*、与 Con 组相比, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*, 与 Con 组相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

2.4 代谢途径分析

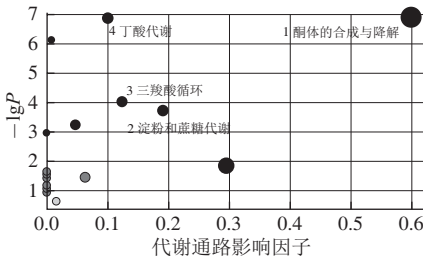


图6 通过MetPA得到的通路分析概要图

Fig.6 Diagram of pathway analysis with MetPA

为了研究山西老陈醋相关标志物所涉及的代谢途径, 以及各个标志物之间可能的相关性, 本研究采用 MetPA 数据库进行分析。如图6所示, 大鼠血清和尿液中山西老陈醋相关的15个代谢产物主要参与了18条代谢通

路。图中横坐标代谢通路影响因子表征由拓扑分析计算所得的代谢通路的重要性值, 纵坐标 $-\lg P$ 表示代谢通路富集分析的显著性水平。本研究将代谢通路影响值设置为 $0.10^{[18]}$ , 当代谢通路影响值高于这个值且 $P < 0.05$ 时, 即被视为潜在的靶标代谢路径。如表4所示, 山西老陈醋对大鼠机体的影响主要与酮体的合成与降解、淀粉和蔗糖代谢、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和丁酸甲酯代谢4条通路有关。

表4 代谢通路分析结果  
Table 4 Results from pathway analysis

代谢通路影响因子	化合物总数	准确匹配化合物数	P	$-\lg P$	Holm P	误判率	影响因子	详情
丁酸甲酯代谢	0.213 98	3	0.001 014	6.893 8	0.082 137	0.042 501	0.101 45	KEGG
酮体的合成与降解	0.053 495	2	0.001 049 4	6.859 5	0.083 953	0.042 501	0.6	KEGG
糖酵解或糖异生	0.278 17	3	0.002 224 6	6.108 2	0.175 75	0.060 066	0.007 78	KEGG
三羧酸循环	0.213 98	2	0.018 17	4.008	1.0	0.367 94	0.121 55	KEGG
淀粉和蔗糖代谢	0.246 08	2	0.023 75	3.740 2	1.0	0.384 75	0.189 93	KEGG
甘油磷脂代谢	0.320 97	2	0.039 109	3.241 4	1.0	0.527 98	0.046 3	KEGG
谷氨酰胺和谷氨酸代谢	0.053 495	1	0.052 436	2.948 2	1.0	0.606 76	0.0	KEGG
乙醛酸和乙醛酸盐代谢	0.171 18	1	0.158 9	1.839 5	1.0	1.0	0.296 3	KEGG
磷酸戊糖通路	0.203 28	1	0.185 93	1.682 4	1.0	1.0	0.0	KEGG
果糖和甘露糖代谢	0.203 28	1	0.185 93	1.682 4	1.0	1.0	0.0	KEGG
丙酮酸代谢	0.235 38	1	0.212 15	1.550 5	1.0	1.0	0.0	KEGG
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.256 78	1	0.229 19	1.473 2	1.0	1.0	0.063 29	KEGG
半乳糖代谢	0.278 17	1	0.245 89	1.402 9	1.0	1.0	0.001 69	KEGG
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	0.342 37	1	0.293 97	1.224 3	1.0	1.0	0.0	KEGG
氨基酸和核糖代谢	0.395 86	1	0.331 84	1.103 1	1.0	1.0	0.0	KEGG
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	0.406 56	1	0.339 18	1.081 2	1.0	1.0	0.0	KEGG
酪氨酸代谢	0.449 36	1	0.367 8	1.000 2	1.0	1.0	0.0	KEGG
甾类激素生物合成	0.748 93	1	0.538 02	0.619 86	1.0	1.0	0.015 29	KEGG

在能量代谢三羧酸循环中, 由乙酰辅酶A与草酰乙酸缩合成的柠檬酸是TCA的重要调节点, 柠檬酸脱氢脱羧生成α-酮戊二酸, 是TCA的限速步骤, α-酮戊二酸再经过脱氢脱羧后生成苹果酸, 苹果酸在苹果酸脱氢酶作用下生成草酰乙酸, 而草酰乙酸重复再利用, 整个循环主要消耗的是乙酰辅酶A<sup>[19]</sup>。在本研究中, 给醋组大鼠尿液中TCA的重要中间产物如柠檬酸、苹果酸、α-酮戊二酸的含量升高, 说明山西老陈醋对TCA有促进作用, 能影响机体内的能量代谢。此外, 本研究中给醋组大鼠血清中α-葡萄糖、β-葡萄糖含量减少, 说明山西老陈醋通过促进机体能量代谢还可能具有一定的降血糖作用。另外, 研究报道食醋可以促进机体能量循环, 具体机制是: 食醋中的大部分醋酸与草酰乙酸反应合成柠檬酸, 少部分醋酸在肝脏中与辅酶A结合生成乙酰辅酶A, 柠檬酸和乙酰辅酶A都是TCA的底物, 它们的增多可促进TCA的进行<sup>[20-21]</sup>。此外, 食醋中还含有一定量的氨基酸、微量柠檬酸、苹果酸、琥珀酸等与TCA有关的有机酸和 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 等碱性金属阳离子, 它们均能促进TCA的顺利进行<sup>[22]</sup>。这也说明了本研究结果与文献报道一致。

正常人体的体液呈弱碱性,人的疲劳感是因为人体体液呈现酸性所致。当人经过激烈运动或劳动,或食用大量的酸性食品时,就会在体内堆积大量乳酸,乳酸是机体进行无氧代谢的产物,是身体代谢的废物,能够使人持续疲劳、神经疼痛、出现昏睡现象,引起一系列慢性疾病。而乳酸的清除主要是在乳酸脱氢酶的作用下,将乳酸转变成丙酮酸,然后进入TCA被彻底氧化分解,生成 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[22-23]</sup>。人摄入食醋后,可促进TCA的进行,从而减少乳酸、丙酮酸的堆积,保持体液呈中性至微碱性,达到消除疲劳的作用<sup>[24-25]</sup>。本研究结果显示,给醋组大鼠血清中乳酸含量降低,其原因在于山西老陈醋可促进机体TCA,减少乳酸、丙酮酸的堆积,使体液处于中性至微碱性,从而体现出一定的抗疲劳作用。

脂质代谢是机体重要的代谢之一,在脂质代谢中,脂类物质分解为脂肪酸和甘油,脂肪酸通过 $\beta$ -氧化生成乙酰辅酶A,部分乙酰辅酶A进入TCA最终成为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ ,并在此过程中释放能量;另一部分乙酰辅酶A在肝线粒体经酶催化生成酮体,即乙酰乙酸、3-HB、丙酮,而酮体可以为组织提供能源。胆碱是脂质代谢的重要产物之一,是卵磷脂的组成成分,可以调控细胞凋亡、促进脂肪代谢、降低血清胆固醇水平<sup>[26]</sup>。胆碱进一步的代谢可涉及到3个不同的通路:一是胆碱被氧化为甜菜碱;二是胆碱通过肠道菌群转化为甲胺类(三甲胺、TMAO和二甲胺);三是胆碱被磷酸化生成PC与GPC。TMAO能够保持细胞渗透压、稳定蛋白质结构、增加胆汁体积、减少脂肪沉积<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,给醋组大鼠血清中脂质、PC、GPC含量减少,而乙酰乙酸、3-HB、丙酮、胆碱、TMAO含量增加,即食醋对机体的脂质代谢、胆碱代谢具有一定调节作用,能够促进脂肪的分解,表现出一定降血脂作用,这与文献<sup>[28]</sup>报道一致。马尿酸是肠道微生物菌群代谢食物中酚类和芳环类氨基酸的产物,本研究结果显示山西老陈醋对大鼠肠道微生物菌群也具有一定的调节作用。

### 3 结 论

本研究采用基于NMR的代谢组学技术研究了山西老陈醋对大鼠机体内源性代谢组的影响。结果显示,灌胃给予山西老陈醋的大鼠血液和尿液代谢组与空白组明显不同,影响较大的代谢物主要包括 $\alpha$ -葡萄糖、 $\beta$ -葡萄糖、乳酸、柠檬酸、苹果酸、脂质和马尿酸等。这些内源性代谢物主要涉及机体的能量代谢、糖代谢、脂肪代谢等途径,其含量变化趋势从代谢组学角度说明了山西老陈醋具有促进能量代谢、降血糖、降血脂和抗疲劳等功效。

代谢组学为营养学提供了一种系统全面的分析手段,从整体水平上展现了营养物质对机体造成的细微变

化,能高通量地研究物质在体内的代谢情况,为研究物质在机体的各种代谢途径提供了可能,并能寻找营养物质在机体代谢的潜在生物标志物,揭示营养物质对机体影响的规律和机制。本研究通过大鼠血液、尿液内源性代谢组的变化,全面系统地反映了给予山西老陈醋的大鼠体内生物化学过程和状态的变化,并最终推测了山西老陈醋对大鼠机体影响的作用机制。与已有研究相比,代谢组学分析不是采用单一指标描述机体变化,而是通过多层次、整体观的多种代谢物终端信息网络变化阐明外源性食物的作用机制。此外,外源性膳食作用后的机体代谢物处于相互影响的代谢网络中,具有整体性的代谢组学分析还可以同时监测代谢物之间的相互作用。虽然 $^1\text{H}$  NMR分析具有重现性好、备样简单、分析时间短、无破坏性等优点,但其灵敏度较低。由于体液的化学成分非常复杂,单一的NMR分析难以检测到体液中的所有代谢产物,因此后续工作应进一步采用液相色谱-质谱联用和气相色谱-质谱联用等其他分析手段,通过多种分析方法的集成联用,发现更多的生物标志物,从而全面分析山西老陈醋对机体的代谢影响,揭示山西老陈醋对机体的其他营养作用机制。

### 参考文献:

- [1] 吴鸣. 食醋质量与微量成分分析[J]. 江苏调味副食品, 2003(1): 1-4.
- [2] KONDO S, TAYAMA K, TSUKAMOTO Y, et al. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(12): 2690-2694.
- [3] CHOI M J, CHO H J, CHOI M S, et al. Effects of garlic vinegar supplementation on body weight, blood glucose, and serum lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats-fed high cholesterol diet[J]. *Journal of Food Science and Nutrition*, 1999, 4(3): 200-202.
- [4] TAKEUCHI H, OHISHI Y, OZAKI Y, et al. Effect of acetic acid or rice vinegar feeding after exercise on blood glucose in fasted and running-trained rats[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(2): 338-340.
- [5] LILJEBERG H, BJÖRCK I. Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 52(5): 368-371.
- [6] 王元太, 程光胜. 山西老陈醋的工艺精华和产品特点[J]. *中国酿造*, 2004, 23(5): 7-9.
- [7] 陈树俊, 苏静, 张海英, 等. 山西老陈醋功效成分的研究进展[J]. *农产品加工: 创新版*, 2009(12): 45-49.
- [8] BECKONERT O, COEN M, KEUN H C, et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(6): 1019-1032.
- [9] LLORACH R, GARCIA-ALOY M, TULIPANI S, et al. Nutrimetabolomic strategies to develop new biomarkers of intake and health effects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(36): 8797-8808.

- [10] XIE Guoxiang, LI Xin, LI Houkai, et al. Toward personalized nutrition: comprehensive phytoprofilng and metabotyping[J]. Journal of Proteome Research, 2013, 12(4): 1547-1559.
- [11] XIE Guoxiang, YE Mao, WANG Yungang, et al. Characterization of pu-erh tea using chemical and metabolic profiling approaches[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(8): 3046-3054.
- [12] JIMÉNEZ-GIRÓN A, IBÁÑEZ C, CIFUENTES A, et al. Faecal metabolomic fingerprint after moderate consumption of red wine by healthy subjects[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 14(2): 897-905.
- [13] van DORSTEN F A, DAYKIN C A, MULDER T P J, et al. Metabonomics approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(18): 6929-6938.
- [14] SHI Xiaohuo, XIAO Chaoni, WANG Yulan, et al. Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 12(2): 991-1006.
- [15] DIAO Chengfeng, ZHAO Liangcai, GUAN Mimi, et al. Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a <sup>1</sup>H-NMR based metabonomic approach[J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(3): 686-693.
- [16] BOUATRA S, AZIAT F, MANDAL R, et al. The human urine metabolome[J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e73076. doi: 10.1371/journal.pone.0073076.
- [17] 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚. 植物代谢组学-方法与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 112-113.
- [18] 黄美艳, 唐于平, 李伟霞, 等. 采用代谢组学策略研究佛手散对急性血瘀大鼠的活血化瘀作用机制[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3576-3582.
- [19] 史红超, 苏铁柱. 三羧酸循环及其影响因素对运动能力的影响[J]. 辽宁体育科技, 2011, 33(3): 45-47.
- [20] 徐清萍, 敖宗华, 陶文沂. 食醋功能研究进展(上)[J]. 中国调味品, 2003(12): 11-12.
- [21] 徐清萍, 敖宗华, 陶文沂. 食醋功能研究进展(下)[J]. 中国调味品, 2004(1): 19-23.
- [22] 刘君雯, 龙芬. 食醋减控体重及抗疲劳功能研究综述[J]. 河北体育学院学报, 2008, 22(3): 66-69.
- [23] 包启安. 食醋的机能性[J]. 中国酿造, 1995, 14(4): 2-6.
- [24] 包启安. 关于食醋的机能性[J]. 上海调味品, 1995(2): 1-4.
- [25] 陆培基, 周永治. 恒顺醋胶囊抗疲劳功能研制报告[J]. 中国调味品, 2002(10): 8-10.
- [26] 马维英, 王爽, 卢立志, 等. 饲料胆碱水平对绍兴鸭脂质代谢的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 233-242.
- [27] 陈军, 周海霞. 浅谈氧化三甲胺(TMAO)[J]. 科技创新导报, 2012(19): 143-144.
- [28] 刘君雯, 黄迺达, 龙芬. 饮醋对脂代谢的影响研究[J]. 现代预防医学, 2007, 34(17): 3291-3292.