

邱华明,李子祥,金源卿,等. 2型糖尿病气阴两虚证大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 722-732.

Qiu HM, Li ZX, Jin YQ, et al. Urine metabonomics in type 2 diabetes rats with qi yin deficiency syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 722-732.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.004

## 2型糖尿病气阴两虚证大鼠尿液 代谢组学研究

邱华明,李子祥,金源卿,吴曙光\*

(贵州中医药大学,贵阳 550025)

**【摘要】** 目的 通过尿液非靶向代谢组学方法,从代谢差异标志物及代谢通路方面,探讨成年SD大鼠2型糖尿病气阴两虚证的中医证候内在的生物物质基础。方法 将SD大鼠随机分为正常组和2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)气阴两虚证组,采用高脂高糖饲料饲喂、小剂量链脲佐菌素(streptozocin, STZ) 35 mg/kg腹腔注射结合青皮附子散颗粒剂灌胃的方法建立T2DM气阴两虚证模型。利用液质联用(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)技术进行尿液非靶向代谢组学分析,运用主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA),KEGG数据库、HMDB数据库、LIPIDMaps数据库和液相色谱与串联质谱联用(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)等鉴定潜在的生物标志物进行通路富集分析。结果 发现与糖尿病发生相关的代谢物变化涉及碳水化合物代谢9条,脂质代谢12条,氨基酸代谢9条,能量代谢2条。结论 糖尿病气阴两虚证生物模型存在碳水化合物代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、生物能量代谢紊乱,代谢组学研究方法有助于揭示中医证候的微观物质基础。

**【关键词】** 2型糖尿病;气阴两虚证;尿液;代谢组学;代谢通路;能量代谢紊乱

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0722-11

## Urine metabonomics in type 2 diabetes rats with qi yin deficiency syndrome

QIU Huaming, LI Zixiang, JIN Yuanqing, WU Shuguang\*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Corresponding author: WU Shuguang. E-mail: wushuguang688@gzy.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the intrinsic biomaterial basis of the TCM syndrome of type 2 diabetes in adult SD rats through differential metabolic markers and metabolic pathways using urine untargeted metabolomics. **Methods** SD rats were randomly divided into normal and T2DM groups with deficiency of both qi and yin. The T2DM group with deficiency of both qi and yin was established by feeding a high fat and sugar diet combined with intraperitoneal injection of a small dose of streptozotocin (35 mg/kg) and intragastric administration of Qingpi Fuzi powder granules. Untargeted metabolomic analysis of urine was performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Potential biomarkers and pathway enrichment were identified by principal component analysis, partial least squares discriminant analysis, KEGG database, HMDB database, LIPIDMaps database, and MS/MS tandem ion fragment information. **Results** Metabolite

**【基金项目】**国家自然科学基金(82160957),2021年国家自然科学基金后补助资金科研创新探索专项(2018YFL170810516)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82160957), Special Research and Innovation Exploration Project of NSFC Post-Subsidy Fund in 2021 (2018YFL170810516).

**【作者简介】**邱华明,在读硕士研究生,研究方向:中医基础研究。Email:137415316@qq.com

**【通信作者】**吴曙光,硕士,正高级实验师,硕士研究生导师,研究方向:中医基础理论与实验动物学研究。Email:wushuguang688@gzy.edu.cn

changes related to diabetes were found to involve nine carbohydrate, twelve lipid, nine amino acid, and two energy metabolic pathways. **Conclusions** There are carbohydrate, lipid, amino acid, and bioenergy metabolism disorders in the biological model of qi yin deficiency in diabetes. Metabonomics are helpful to reveal the material basis of TCM syndromes.

**【Keywords】** type 2 diabetes; qi yin deficiency syndrome; urine; metabolomics; metabolic pathway; energy metabolism disorder

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是威胁人类生命安全的一种代谢性疾病,由于胰岛素分泌缺陷或生物作用障碍导致持续性血糖升高为主,伴有糖、蛋白质、脂肪、水、电解质等代谢紊乱的临床综合征<sup>[1]</sup>。研究调查表明,我国成年人群 DM 患病率逐年呈升高趋势,目前为 11.2%,且以 T2DM 为主,占 90%以上<sup>[2]</sup>。糖尿病属于中医学中“消渴病”范畴,主要证型:阴虚热盛型、气阴两虚证、阴阳两虚型和气滞血瘀型,其中气阴两虚证是最常见的中医证型<sup>[3-4]</sup>。《金匱要略·消渴小便不利淋病脉证并治》认为:“寸口脉浮而迟,浮即为虚,迟则为劳,虚则卫气不足,劳则荣气竭。趺阳脉浮而数……即为消渴。”其中“卫虚荣竭”与气虚引发消渴的病机相关。有研究表明气阴两虚证是糖尿病本虚的最常见证候<sup>[5]</sup>。中医药能有效降低糖尿病患者的血糖水平,改善胰岛素抵抗,调节糖脂代谢紊乱,但由于 T2DM 气阴两虚中医证候机制的基础研究缺失,严重制约了中医药防治 DM 的发展。

代谢组学技术是系统生物学的重要组成部分,是以现代仪器为手段,以小分子代谢为目标,代谢组学技术旨在研究生物机体受扰动后其代谢产物的变化或随时间发生的变化,其角度是整体性、动态性的,这与中医学整体观念一致<sup>[6-9]</sup>。中医药作用机体后会存在代谢变化,这些代谢变化正是中医证候的内在表现,因此代谢组学技术成为研究中药作用机制的重要方法。尿液是机体肾生成,由膀胱储存,尿道排出的含有大量代谢物的液体物质,研究疾病相关的尿液,能探明相关代谢产物的代谢状态。本研究以成年 SD 大鼠为对象,运用高脂高糖饲料喂、STZ 35 mg/kg<sup>[10]</sup>腹腔注射大鼠结合青皮附子散颗粒剂灌胃复制 T2DM 气阴两虚证动物模型,采用 LC-MS<sup>[11]</sup> 技术进行尿液非靶向代谢组学研究,利用 PCA、PLS-DA 等多元统计分析<sup>[11]</sup>,观察 2 型糖尿病气阴两虚证大鼠的尿液代谢组学变化,试图探究 2 型糖尿病气阴两虚型的物质作用基础,为中医糖尿病研究提供生物学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级雌性健康 SD 大鼠,10 周龄,体重(180 ~ 220)g,购于贵州中医药大学实验动物研究所【SCXK(黔)2021-0003】。饲喂高脂高糖饲料(基础饲料 + 10%猪油 + 20%蔗糖 + 2.5%胆固醇 + 1%胆酸钠)由小黍有泰(北京)生物科技有限公司提供。饲养条件:5 只/笼,自由进食及饮水,采用 12 h:12 h 昼夜间断照明,温度为(20 ± 2)℃,相对湿度为 50%,饲养于贵州中医药大学实验动物研究所屏障设施【SYXK(黔)2021-0005】。所有操作均经贵州中医药大学动物研究伦理委员会批准(IACUC 20220015)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

甲醇(Thermo Fisher 公司, A456-4),质谱级水(Merck 公司, 1.15333.2500),甲酸(Thermo Fisher 公司, A117-50),醋酸铵(Thermo Fisher 公司, A114-50),链脲佐菌素(北京索莱宝科技有限公司, 104Z021),0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司, 20211228),4%多聚甲醛组织固定液体(biosharp 公司, 22315976)。

Q Exactive™ HF 质谱仪(Thermo Fisher 公司, 德国),Vanquish UHPLC 色谱仪(Thermo Fisher 公司, 德国),Hypesil Gold column 色谱柱(Thermo Fisher 公司, 美国),D3024R 低温离心机(Scilogex 公司, 美国),罗氏卓越型血糖仪(罗氏诊断有限公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组与造模

将所有的大鼠适应性喂养 1 周,随机分为正常组、T2DM 气阴两虚模型组,每组 15 只。气阴两虚模型组每天喂饲高脂高糖饲料,灌服青皮附子散颗粒水冲剂(15.75 g/kg)<sup>[3]</sup>,正常组饲喂普通饲料和灌服相同体积生理盐水每天 1 次。4 周后气阴两虚模型组禁食不禁水 12 h 后腹腔注射小剂量 STZ 溶液(35 mg/kg)<sup>[10]</sup>(在 4℃冰浴中,以 0.1 mol/L 浓度

pH = 4.5 柠檬酸钠缓冲液), 正常组予腹腔注射等体积的柠檬酸钠缓冲液。

### 1.2.2 T2DM 气阴两虚证动物模型建立成功评价标准

(1) 2 型糖尿病造模成功标准: ①大鼠体重明显减低; ②空腹血糖值大于 7.0 mmol/L; ③随机血糖值大于 11.1 mmol/L<sup>[11]</sup>; ④胰岛素抵抗或胰腺 HE 病理切片显示胰岛细胞破坏。

(2) 参照《中药新药临床研究指导原则》中 2 型糖尿病气阴两虚证候表现<sup>[12]</sup>, 制定相关气阴两虚证的中医证候成模评估标准如下: ①神疲、躁动易怒; ②被毛颜色泛黄光泽较少; ③饮水量增多, 摄食减少或增多; ④尿量频多、拉尾排便、尾色变暗; ⑤舌淡红少津<sup>[10]</sup>。符合以上 5 项中的 4 项或全部者即可确定为 2 型糖尿病气阴两虚证模型。

### 1.2.3 大鼠一般情况检测及血糖测定

造模成功后, 正常组和模型组随机每组各选取 10 只, 测定体重(g)、尿量(24 h)、饮水量(24 h), 从第 4 周开始, 每周测定空腹血糖(禁食 12 h)、随机血糖, 尾静脉采血, 采用血糖仪测定血糖值。

### 1.2.4 大鼠胰腺组织 HE 染色观察

根据上述建立的诊断标准, 筛选符合标准的正常组与模型组大鼠, 禁食不禁水后, 麻醉采用腹腔注射 20% 乌拉坦溶液, 剂量为 5 mL/kg, 麻醉后剖腹取胰腺组织用于胰腺 HE 染色病理切片。

### 1.2.5 大鼠尿液样本的制备与处理

根据上述建立的诊断标准, 筛选符合标准的正常组与模型组大鼠, 禁止饲食不禁水后, 用代谢笼盒收集各组大鼠 24 h 尿液, 4℃ (3000 r/min) 离心 10 min, 取上清液, 放置于离心管中, 于液氮中保存。正常组和模型组每组随机选 6 个样本送样。LC-MS/MS 测定前, 在室温下解冻, 取 100 μL 样本置于 EP 管中, 加入 400 μL 的 80% 甲醇水溶液; 涡旋震荡, 冰浴静置 5 min, 12 000 r/min、4℃ 离心 20 min; 取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%; 12 000 r/min、4℃ 离心 20 min, 收集上清, 进行 LC-MS/MS 进行分析。

### 1.2.6 LC-MS/MS 检测条件

①将处理后的尿液样本置于色谱柱温为 40℃, 流速 0.2 mL/min 的色谱条件下, 选取正离子模式为 1% 甲酸、负离子模式为 5 mmol/L 醋酸铵、pH = 9.0 的色谱流动 A 相, 正负离子模式均为甲醇的流动 B 相。②质谱条件: 扫描范围选择  $m/z = 100 \sim 1500$ ;

ESI 源的设置为: 喷雾电压: 3.5 kV; 鞘气流速: 35 psi; 辅助气流速: 10 L/min; 离子传输管温度: 320℃; 离子导入射频电平: 60 V; 辅助气加热器温度: 350℃; 极性: 正、负; 二级扫描为数据依赖性扫描。

### 1.3 统计学分析

首先将质谱检测得到的原始文件导入 Compound Discoverer 3.1 (以下简称 CD3.1) 软件中, 进行谱图处理及数据库搜库, 得到代谢物的定性定量结果, 然后对数据进行质控(QC 相关性分析和总样本 PCA 分析) 保证数据结果的准确度、可靠性。其次使用 KEGG、HMDB、LIPIDMaps 三大数据库对鉴定到的代谢物进行注释。再次利用层次聚类(Hierarchical Cluster Analysis, HCA) 和代谢物相关性分析, 揭示样本之间及代谢物和代谢物之间的关系。最后, 使用 KEGG 数据库来研究代谢物的功能和代谢途径, 当代谢途径的  $P < 0.05$  时, 认为该代谢途径是显著富集。其余实验所得数据均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 21.0 软件作统计分析处理。数据满足正态和方差齐则采用方差分析。检验水平  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般体征变化

造模后模型组大鼠精神萎靡, 倦怠懒动或烦躁易动, 毛发枯黄、无光泽、易脱落, 饮水量、饮食量皆显著增加, 舌色淡红, 小便增多, 大便干、色黑, 出现了明显的气阴两虚的症状, 提示气阴两虚证造模成功。模型组 15 只, 成模 12 只, 造模成功率 80%。造模成功后, 与正常组比较, 模型组大鼠体重显著降低 ( $P < 0.05$ ), 24 h 尿量、24 h 饮水量显著增加 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 两组大鼠一般情况 ( $n = 10$ )

Table 1 General conditions changes of rats in the two groups ( $n = 10$ )

组别 Groups	体重(g) Body mass(g)	24 h 尿量(mL) 24 h urine volume (mL)	饮水量(mL) Water consumption (mL)
正常组 Normal group	274.30 $\pm$ 13.63	19.80 $\pm$ 7.05	20.10 $\pm$ 2.02
模型组 Model group	230.00 $\pm$ 11.19*	55.70 $\pm$ 14.16**	44.00 $\pm$ 7.87*

注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with the normal group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . (The same in the following figure)

## 2.2 血糖动态变化

表 2 结果显示,造模后模型组大鼠的空腹血糖显著高于正常组、随机血糖均显著高于正常组( $P < 0.01$ )。

表 2 两组大鼠血糖变化情况( $n = 10$ )

Table 2 Blood glucose changes of rats in the two groups( $n = 10$ )

组别 Groups	空腹血糖 (mmol/L) Fasting blood glucose (mmol/L)	随机血糖 (mmol/L) Random blood glucose (mmol/L)
正常组 Normal group	4.74 ± 0.29	6.09 ± 0.49
模型组 Model group	20.13 ± 1.91 **	26.42 ± 2.07 **

## 2.3 大鼠胰腺组织 HE 染色结果

正常组切片显示组织染色均匀,腺泡细胞形态结构正常,胰岛数量丰富,形状规则,未见明显炎症。模型组切片显示组织染色均匀,组织中可见多处腺泡细胞变性,胞质中可见大小不一的圆形空泡(黑色箭头),局部可见点状的腺泡细胞坏死,核溶解(黄色箭头);局部胰岛中可见少量胰岛细胞变性(如图 1)。

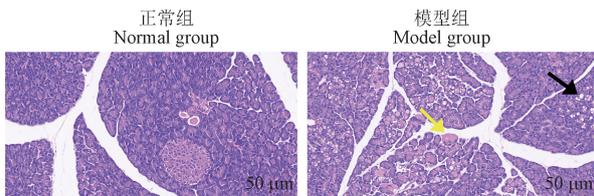


图 1 大鼠胰腺组织病理结果

Figure 1 Pathological results of rat pancreas

## 2.4 LC-MS/MS 实验结果

### 2.4.1 总离子流图检查

总离子流图是采用将正负离子模式下检测所得的质谱离子流图相叠加而成,同一组见色谱峰响应强度和保留时间基本重叠能说明实验过程中的仪器误差情况。如图 2 所示,相应的响应强度与保留时间重叠,说明了此次实验误差较小,数据质量可靠。

### 2.4.2 差异代谢物相关性分析

采用 PCA(图 3)和 PLS-DA(图 4)方法对数据进行分析,本次实验结果是:负离子模式:R2Y = 1, Q2Y = 0.93, 正离子模式:R2Y = 0.99, Q2Y = 0.95,说明其数据可靠性极高。两图结果均显示 T2DM 气阴两虚模型组大鼠和正常组大鼠尿液样本出现较为明显的分离趋势,说明模型组的代谢物存

在比正常组差异显著。

### 2.4.3 差异代谢物筛选

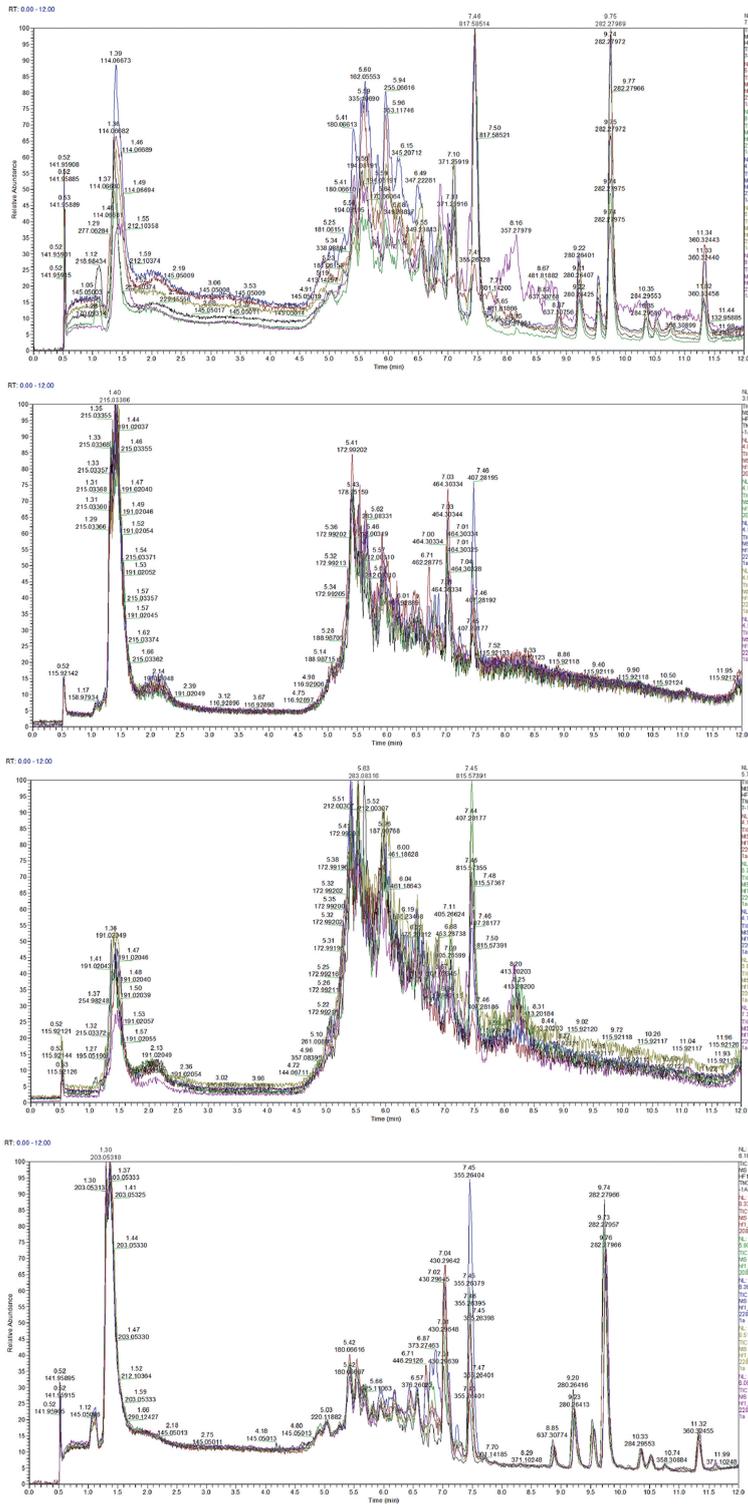
显著性差异代谢物的筛选:差异代谢物的筛选主要参考 FC 和  $P$ -value 两个参数,设定阈值为  $FC < 0.667$  且  $P$ -value  $< 0.05$ ,检索人类代谢组学数据库(HMDB)和京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)鉴定差异代谢物,结果发现,与正常组相比,模型组大鼠尿液正负离子模式下共检测出 40 种差异较为显著的代谢物(见表 3),其中 18 种代谢物下调,22 种代谢物上调。其中碳水化合物代谢:与正常组相比,模型组 D-葡萄糖酸盐(D-glucuronic acid),核糖醇(Ribitol)的水平显著降低;D-葡萄糖酸-1,5-内酯(Gluconolactone),D-甘露糖 6-磷酸酯(D-mannose 6-phosphate),肌醇(Inositol),L-古洛诺-1,4-内酯(L-gulonono-1,4-lactone),D-果糖 6-磷酸(D-fructose 6-phosphate),半乳糖醇(Dulcitol),海藻糖-6-磷酸酯(Trehalose 6-phosphate)水平显著增加;脂质代谢:与正常组相比,模型组茉莉酸(Jasmonic acid),雌二醇(Estradiol),皮质酮(Desoxycortone),皮质醇(Cortisol),17 $\alpha$ -羟孕酮(17alpha-hydroxyprogesterone),11-脱氧皮质醇(Cortodoxone),苯乙缩醛(Phenylacetyl-glycine),前列腺素 I2(Prostaglandin I2,PGI2)、醛固酮(Aldosterone)的水平显著降低,二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid),棕榈酸(Palmitic acid)的水平显著增加;氨基酸代谢:与正常组相比,模型组 D-脯氨酸(D-proline),L-犬尿氨酸(L-kynurenine),精胺(spermine)的水平显著降低,N-乙酰鸟氨酸(N-acetylmithine),羟脯氨酸(hydroxyproline),三甲基-L-赖氨酸(N<sub>6</sub>,N<sub>6</sub>,N<sub>6</sub>-trimethyl-L-lysine),L-蛋氨酸(methionine),L-组氨酸(1-methylhistidine),3-羟基-L-酪氨酸(Levodopa)的水平显著增加;属于能量代谢的:与正常组相比,模型组肌苷(inosine)与伪尿苷(pseudouridine)含量增加。

### 2.4.4 代谢通路分析

以 KEGG Pathway 为单位,通过 Pathway 富集能确定由上述经筛选得到的差异代谢物参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径,具体富集通路如图 5 所示。得到通路富集的  $P$ -value 值,其中以  $P$ -value  $\leq 0.05$  为阈值,满足此条件的 KEGG 通路定义为在差异代谢物中显著富集的 KEGG 通路,根据富集结果发现与疾病相关的通路,分别是碳水化合物代谢(磷酸戊糖途径、半乳糖代谢、淀

粉和蔗糖代谢);脂质代谢(脂肪酸代谢、脂肪酸伸长率、脂肪酸降解、脂肪酸生物合成、类固醇激素生物合成、醛固酮调节钠的重吸收);蛋白质代谢

(半胱氨酸和蛋氨酸的代谢、磷酸肌醇代谢,  $\alpha$ -亚麻酸代谢);胰岛素抵抗;氧化应激(氧化磷酸化、花生四烯酸代谢)。



注:CTR;正常组;DMM;模型组。

图2 大鼠尿液 LC-MS/MS 总离子流图

Note. CTR. Normal group. DMM. Model group.

Figure 2 LC-MS/MS total ion current diagram of rat urine

表 3 筛选出的潜在生物标志物及其变化趋势

Table 3 Potential biomarkers screened and their changing trends

序号 Serial No	代谢物名称 Name of metabolite	分子式 Molecular formula	P-value	RT (min)	质荷比 m/z	变化趋势 Up and down	通路 KEGG_pathway
1	醛固酮 Aldosterone	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	0.000 079 600	6.343	405.1904	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
2	核糖醇 Ribitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0.000 198 187	1.342	151.0619	下调 Down	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化 Mutual conversion of pentose and glucuronic acid
3	茉莉酸 Jasmonic acid	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	0.000 333 475	6.308	209.1191	下调 Down	α-亚麻酸代谢 α-linolenic acid metabolism
4	D-葡萄糖酸-1,5-内酯 Gluconolactone	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.000 667 167	1.660	177.0412	上调 Up	磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway
5	D-甘露糖 6-磷酸酯 D-mannose 6-phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	0.000 955 903	1.512	259.0228	上调 Up	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism
6	肌醇 Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.001 445 447	1.311	179.0568	上调 Up	半乳糖代谢 Galactose metabolism
7	肌苷 Inosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	0.001 888 372	1.406	267.0726	上调 Up	嘌呤代谢 Purine metabolism
8	L-古洛诺-1,4-内酯 L-gulono-1,4-lactone	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.002 055 568	1.402	177.0413	上调 Up	抗坏血酸和醛酸盐代谢 Metabolism of ascorbic acid and aldolate
9	D-葡萄糖酸盐 D-saccharic acid	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	0.006 986 805	1.273	209.0312	下调 Down	抗坏血酸和醛酸盐代谢 Metabolism of ascorbic acid and aldolate
10	D-脯氨酸 D-proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	0.009 317 282	4.925	114.0564	下调 Down	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
11	雌二醇 Estradiol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0.010 306 915	6.226	271.1708	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
12	伪尿苷 Pseudouridine	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	0.011 363 471	1.399	243.0628	上调 Up	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism
13	D-果糖 6-磷酸 D-fructose 6-phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	0.000 003 810	1.496	261.0378	上调 Up	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
14	N-乙酰鸟氨酸 N-acetylmornithine	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.000 004 400	1.397	175.1083	上调 Up	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis
15	半乳糖醇 Dulcitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.000 006 380	1.302	183.0870	上调 Up	半乳糖代谢 Galactose metabolism
16	L-犬尿氨酸 L-kynurenine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.000 010 600	5.082	209.0930	下调 Down	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism
17	羟脯氨酸 Hydroxyproline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	0.000 011 300	1.335	132.0660	上调 Up	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
18	N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> -三甲基-L-赖氨酸 N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> ,N <sub>6</sub> -trimethyl-L-lysine	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.000 012 900	1.253	189.1605	上调 Up	赖氨酸降解 Lysine degradation
19	皮质酮 Desoxycortone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	0.000 016 000	8.560	331.2276	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
20	硫胺素 Thiamine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS	0.000 059 600	1.344	265.1124	上调 Up	硫胺素代谢 Thiamine metabolism
21	烟酸 Nicotinuric acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.000 084 300	5.248	181.0615	下调 Down	烟酸盐和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism
22	皮质醇 Cortisol	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	0.000 192 462	6.152	363.2176	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
23	二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0.000 296 598	6.629	329.2484	上调 Up	不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids
24	L-蛋氨酸 Methionine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	0.000 331 098	1.401	150.0554	上调 Up	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism
25	N-L-组氨酸 1-methylhistidine	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.000 457 389	1.374	170.0929	上调 Up	组氨酸代谢 Histidine metabolism

续表 3

序号 Serial No	代谢物名称 Name of metabolite	分子式 Molecular formula	<i>P</i> -value	RT (min)	质荷比 m/z	变化趋势 Up and down	通路 KEGG_pathway
26	17 $\alpha$ -羟孕酮 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	0.000 478 191	11.969	331.2277	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
27	脱氧肌苷 Deoxyinosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	0.000 576 382	5.673	253.0934	下调 Down	嘌呤代谢 Purine metabolism
28	海藻糖 Trehalose 6-phosphate	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	0.000 777 893	1.460	343.1246	上调 Up	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
29	11-脱氧皮质醇 Cortodoxone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	0.001 393 187	6.502	347.2228	下调 Down	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
30	吡哆醛 Pyridoxal	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	0.001 727 928	4.804	146.0817	下调 Down	维生素 B <sub>6</sub> 代谢 Vitamin B <sub>6</sub> metabolism
31	鸟苷酸 Guanosine monophosphate	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> P	0.001 820 708	1.420	364.0643	上调 Up	嘌呤代谢 Purine metabolism
32	3-羟基-L-酪氨酸 Levodopa	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	0.002 905 069	5.242	198.0770	上调 Up	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism
33	2'-脱氧腺苷 5'-磷酸 2'-Deoxyadenosine 5'-phosphate, dAMP	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	0.003 260 108	5.286	332.0747	上调 Up	嘌呤代谢 Purine metabolism
34	海藻糖-6-磷酸酯 Trehalose 6-phosphate	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub> P	0.003 403 838	5.238	423.0914	上调 Up	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
35	苯乙缩醛 Phenylacetylglucine	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	0.004 337 422	5.537	194.0818	下调 Down	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism
36	精胺 Spermine	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	0.005 588 057	1.175	203.2237	下调 Down	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
37	前列腺素 I <sub>2</sub> Prostaglandin I <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	0.006 257 626	7.005	353.2317	上调 Down	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism
38	2'-脱氧腺苷 Deoxyadenosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	0.007 816 712	1.420	252.1086	上调 Up	嘌呤代谢 Purine metabolism
39	棕榈酸 Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0.020 786 482	6.418	129.1280	上调 Up	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis
40	维生素 A Vitamin A	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	0.025 974 075	7.063	287.2377	下调 Down	视黄醇代谢 Retinol metabolism

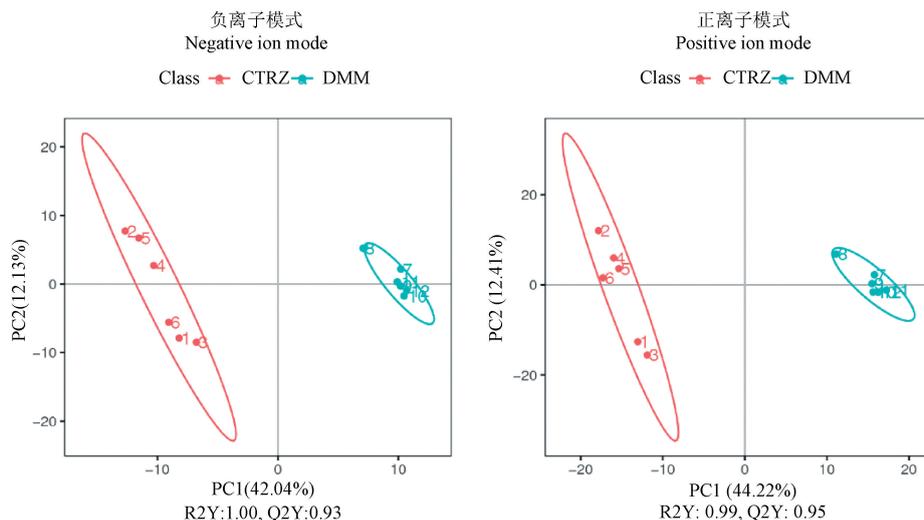


图 3 大鼠尿液正负离子模式 PCA 分析

Figure 3 PCA analysis of positive and negative ion patterns in rat urine

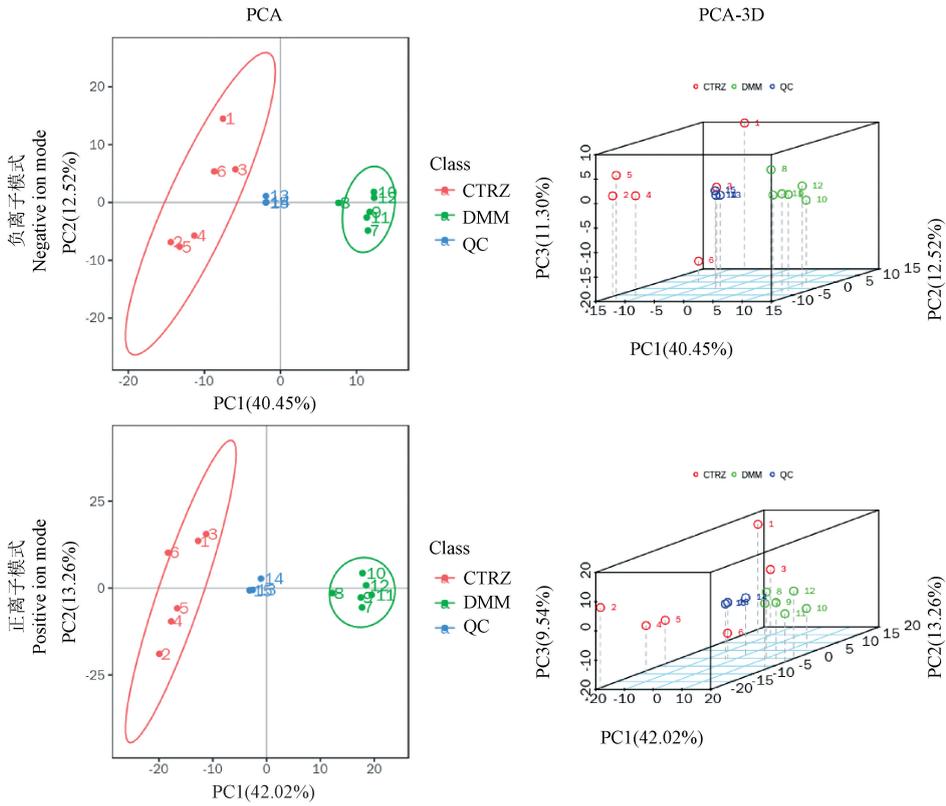


图 4 大鼠尿液正负离子模式 PLS-DA 分析

Figure 4 PLS-DA analysis of positive and negative ion modes in rat urine

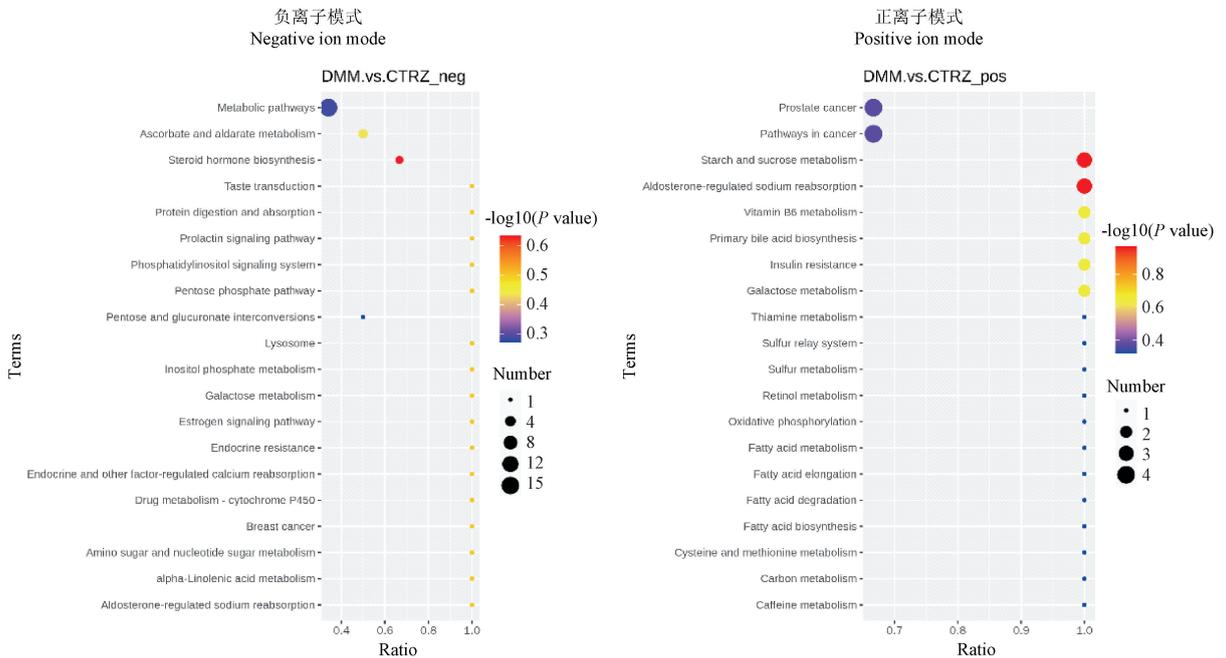


图 5 大鼠尿液正负离子模式代谢通路 KEGG 富集结果

Figure 5 KEGG enrichment results of positive and negative ion metabolic pathway in rat urine

### 3 讨论

自 20 世纪 80 年代以来,我国进行的多次糖尿

病的流行病学调查发现,中国老年糖尿病患者率逐年明显升高,而且老年患者已经成为我国糖尿病的主流人群,其中  $\geq 95\%$  的老年患者均为

T2DM<sup>[13-14]</sup>。高龄、糖尿病会显著增加心脑血管疾病或其他流行性疾病的死亡率<sup>[15-16]</sup>,根据现代医学科学实验技术研究低价高效的降糖药一直是糖尿病新药开发利用的一大热点。代谢组学旨在研究在受到刺激或扰动时,机体(细胞、组织、生物个体)作出相关反应导致的某些差异代谢产物变化或其随着时间周期的代谢通路的变化,从而实现了两组或者多组具有特征性的生物代谢模型比较,为研究以整体思维与辨证论治为特点的中医证候研究提供了新的可行性。

STZ 是一种能够选择性的破坏一定种属动物的胰岛  $\beta$  细胞,对于大鼠造模而言大剂量(65 ~ 70 mg/kg)注射能直接引起胰岛  $\beta$  细胞的广泛破坏,可造成 1 型糖尿病模型,小剂量(25 ~ 40 mg/kg)注射能直接引起胰岛  $\beta$  细胞的部分破坏,造成其他组织对胰岛素不甚敏感,结合高脂高糖喂养,能诱导复制出更接近于临床上 2 型糖尿病的动物模型。本研究运用高糖高脂饲料饲养 SD 大鼠 4 周,结合禁食不禁水 12 h 后 STZ 35 mg/kg 腹腔注射,多次不定时间检测空腹血糖和随机血糖均大于 11.2 mmol/L,模型组 15 只 SD 大鼠,造模成功 12 只,成模率 80%。青皮能破气,附子能伤阴,采用灌胃青皮附子散颗粒水冲剂(15.75 g/(kg·d))28 d 能最大限度地造成气阴两虚的中医证候动物模型。此研究采用西医病因造模结合中医病因造模能最大程度上复制 T2DM 气阴两虚证的中医病证结合动物模型。

本实验研究发现 T2DM 气阴两虚证大鼠模型组比正常组发生了明显差异性的代谢通路变化,其中有 12 条与脂质代谢有关,9 条与碳水化合物代谢有关,15 条与蛋白质代谢有关,2 条与能量代谢有关。

### 3.1 碳水化合物代谢

半乳糖醇(dulcitol)是一种通过还原半乳糖而衍生的糖醇,在眼晶状体内积累后会造成本内障;在模型组的 SD 大鼠眼睛有明显的炎症或者翳障横生。海藻糖 6-磷酸(T6P)调节细胞中的糖水平和淀粉代谢,与各种信号通路相互作用,机体在将 T6P 转化为海藻糖(Tre)后,海藻糖在外界条件刺激下充当重要的渗透保护剂,Tre 和 T6P 还能通过增加酶和非酶抗氧化剂来降低氧化应激<sup>[17]</sup>。肌肉肌醇(inositol)是鸟类、哺乳类动物机体的必需营养源,肌肉肌醇的缺乏,可引起小鼠脱毛和大鼠眼周围异常等症状,大鼠可大量代谢肌醇,但尿中排出的量并不多,本次研究中模型组大鼠毛发无光泽、易脱

落可能与大鼠大量排泄肌醇有关。5-焦磷酸(1,2,3,4,6)-五磷酸肌醇(5-pyrophosphate(1,2,3,4,6)-Inositol pentaphosphate,5-InsP7)是六磷酸肌醇激酶 1(Inositol hexaphosphate kinase 1,IP6K1)的产物,5-InsP7 与 Akt/PKB 在其 pleckstrin 同源结构域结合,能阻止与磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸的相互作用,从而减少 Akt/PKB 膜转位和胰岛素刺激的葡萄糖摄取<sup>[18]</sup>,这可能是模型组大鼠血糖偏高原因之一。

### 3.2 脂质代谢

棕榈酸(palmitic acid)能通过抑制  $\beta$  细胞关键转录因子的表达,引起  $\beta$  细胞去特征化,从而引起  $\beta$  细胞的胰岛素分泌功能受损,造成模型组大鼠血糖升高<sup>[19]</sup>。二十二碳六烯酸(DHA)是哺乳动物和鱼类生物膜的重要组成部分和一些激素的主要前体,能降低血糖,缓解糖尿病症状<sup>[20]</sup>。前列腺素 I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)是一种脂质介质,对机体具有强大的抗炎作用,研究表明 PGI<sub>2</sub> 可能通过刺激 IP 受体的激动作用通过依赖于 cAMP/PKA 的肾单位磷酸化增加胰岛素释放<sup>[21]</sup>,控制血糖,模型组 PGI<sub>2</sub> 含量减少,也从侧面证明模型造模成功。皮质醇(cortisol)能促进糖异生,抑制蛋白质合成,加快对糖原的利用和脂肪分解,从而为生命运动提供能量。皮质酮(desoxycortone)降低会减少机体内胰岛淀粉样蛋白与胰岛素 1(Ins1)的比例,减缓胰岛  $\beta$  细胞增殖,虽然不能增加完整的全长胰岛素水平,但能在短时间内减低酶活性,提高机体血糖水平<sup>[22]</sup>。模型组 17 $\alpha$ -羟孕酮(17 $\alpha$ -OHP),皮质醇,皮质酮雌二醇(estradiol),11-脱氧皮质醇(cortodoxone)等激素类代谢产物含量减少,造成相关的能量代谢减少,也正是气阴两虚证的具体表现之一,可能作为 T2DM 气阴两虚证的生物标志物<sup>[23]</sup>。

### 3.3 氨基酸代谢

蛋氨酸(methionine)是机体必需氨基酸,能维持生长发育和氮平衡,蛋氨酸能促进肝内脂肪代谢,减少脂肪的积聚,因其分子中所含的硫原子能清除自由基,是一种很好的抗氧化剂。3-羟基-L-酪氨酸(levodopa)改善人体视觉对比敏感度,减少固视暗点及提高视力,相关新型酪氨酸酶可以被认为是左旋多巴及多巴胺合成的生物催化剂<sup>[24]</sup>。L-犬尿氨酸(L-KYN)是一种内源性代谢物,容易氧化,这种氧化还原特性可能在其保护作用中起重要作用,是一种潜在的内源性抗氧化剂,在现代研究的实验模型中被用于神经的防护。它的减少能代表

模型组大鼠抗氧化作用减轻,存在神经损伤可能<sup>[25]</sup>。

### 3.4 能量代谢

肌苷(inosine)能在体内代谢为肌苷酸(inosinic acid)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate),能穿过细胞膜进入细胞内,因能提高辅酶 a 与丙酮酸氧化酶的活性,使细胞在缺氧状态下进行核酸代谢、细胞能量代谢等,为机体提供能量,具有抗炎免疫调节和神经保护作用。模型组肌苷与伪尿苷(pseudouridine)含量增加,代表模型组大鼠处于严重的缺氧状态下的能量代谢异常。

本实验经过综合分析 2 型糖尿病气阴两虚证大鼠尿液样本中的差异代谢物,结合胰腺病理检测、一般气阴两虚证的特征证候群、相关多维统计研究,探索 2 型糖尿病气阴两虚证大鼠的生物代谢差异物和相关的代谢模式,为相关疾病的中医证候研究提供了新的依据和方法。

### 参 考 文 献(References)

[ 1 ] 许琳. 糖尿病的形成机理(病因)及其临床诊断标准 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1426-1429.  
Xu L. Formation mechanism (etiology) and clinical diagnostic criteria of diabetes mellitus [J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(3): 1426-1429.

[ 2 ] 赵能江, 张智海, 陈薇, 等. 《中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)》亮点解读及糖尿病中医指南分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(6): 652-655.  
Zhao NJ, Zhang ZH, Chen W, et al. Interpretation of highlights of China guidelines for prevention and treatment of type 2 diabetes (2020 edition) and analysis of TCM guidelines for diabetes [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(6): 652-655.

[ 3 ] 曾梦莹, 何新苗, 苏比努尔, 等. 定量代谢组学研究气阴两虚糖尿病大鼠血清小分子代谢特征谱 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3313-3317.  
Zeng MY, He XM, Su BNE, et al. Quantitative metabolomics study on serum small molecules metabolic profiling in diabetes mellitus rats with syndrome of both qi and Yin deficiency [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(8): 3313-3317.

[ 4 ] 侯清涛, 李芸, 李舍予, 等. 全球糖尿病疾病负担现状 [J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(1): 92-96.  
Hou QT, Li Y, Li SY, et al. The global burden of diabetes mellitus [J]. Chin J Diabetes, 2016, 24(1): 92-96.

[ 5 ] 代培, 谢培凤, 刘铜华, 等. 2 型糖尿病患者中医证型的分布特点及主要证型中患者体重指数与兼证的相关性 [J]. 中医杂志, 2021, 62(15): 1338-1342.  
Dai P, Xie PF, Liu TH, et al. Patterns distribution characteristics of type 2 diabetes and the correlation between body mass index and concomitant syndromes for main traditional Chinese medicine patterns [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62

(15): 1338-1342.

[ 6 ] 彭晓婷, 马琪, 张晓松, 等. 湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 700-708.  
Peng XT, Ma Q, Zhang XS, et al. Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 700-708.

[ 7 ] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 等. 基于 LC-MS 的冠心病病人源菌群小鼠代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 323-329.  
Zhu H, Guo YX, Du XP, et al. Metabolic analysis of human flora-associated mice with coronary heart disease using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 323-329.

[ 8 ] 汤喜兰, 徐国良, 董伟, 等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 486-493.  
Tang XL, Xu GL, Dong W, et al. Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 486-493.

[ 9 ] 吴佳芸, 李玲玲, 乔佳君, 等. 持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 428-439.  
Wu JY, Li LL, Qiao JJ, et al. A serum metabolomics-based study on persistent hypertensive SHR [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 428-439.

[ 10 ] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.  
Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.

[ 11 ] 李敏, 杨晨钰, 傅超慧, 等. 马齿苋/甘草/蒲公英及其复方改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 517-524.  
Li M, Yang CY, Fu CH, et al. Study of purslane/licorice/dandelion compound on insulin resistance in type 2 diabetic rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 517-524.

[ 12 ] 郑筱蓂. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.  
Zheng XY. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.

[ 13 ] 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南(2022 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(1): 2-51.  
Clinical guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in the elderly in China (2022 edition) [J]. Chin J Diabetes, 2022, 30(1): 2-51.

[ 14 ] Li Y, Teng D, Shi X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study [J]. BMJ, 2020, 369: m997.

- [15] Bornstein SR, Rubino F, Khunti K, et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19 [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(6): 546–550.
- [16] Zhu LH, She ZG, Cheng X, et al. Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and preexisting type diabetes [J]. *Cell Metab*, 2020, 31: 1068–1077.
- [17] Mohsin SM, Fardus J, Nagata A, et al. Comparative study of trehalose and trehalose 6-phosphate to improve antioxidant defense mechanisms in wheat and mustard seedlings under salt and water deficit stresses [J]. *Stresses*, 2022, 2(3): 336–354.
- [18] Wilson MS, Jessen HJ, Saiardi A. The inositol hexakisphosphate kinases IP6K1 and-2 regulate human cellular phosphate homeostasis, including XPR1-mediated phosphate export [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(30): 11597–11608.
- [19] 刘娜, 刘腾丽, 王乐, 等. 棕榈酸诱导人胰岛  $\beta$  细胞去特征化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(10): 1747–1755.  
Liu N, Liu TL, Wang L, et al. Palmitic acid induces loss of  $\beta$ -cell identity in human islets [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(10): 1747–1755.
- [20] Sousa LFB, Oliveira HBM, das Neves Selis N, et al.  $\beta$ -caryophyllene and docosahexaenoic acid, isolated or associated, have potential antinociceptive and anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 19199.
- [21] Norlander AE, Peebles RS. Prostaglandin I<sub>2</sub> and T regulatory cell function: broader impacts [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(10): 1231–1234.
- [22] Antevska A, Long CC, Dupuy SD, et al. Mouse pancreatic peptide hormones probed at the sub-single-islet level: the effects of acute corticosterone treatment [J]. *J Proteome Res*, 2023, 22(1): 235–245.
- [23] 蔺亚东. 糖尿病肾病气阴两虚证小鼠模型的建立及芪术颗粒的干预作用 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2020.  
Lin YD. Establishment of the mouse model of diabetic nephropathy with Qi and Yin deficiency syndrome and the intervention of Qi-Zhu granule [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2020.
- [24] Cha GS, Mok JA, Yun CH, et al. Production of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine using novel tyrosinases from *Bacillus megaterium* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2022, 160: 110069.
- [25] Ramírez Ortega D, Ugalde Muñoz PE, Blanco Ayala T, et al. On the antioxidant properties of L-kynurenine: an efficient ROS scavenger and enhancer of rat brain antioxidant defense [J]. *Antioxidants*, 2021, 11(1): 31.

[收稿日期] 2023-01-07

## 《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

### 一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

### 二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!