

基于LC-MS研究芍药汤对溃疡性结肠炎 大鼠粪便代谢产物的影响

刘星赐¹, 吴东升², 曹晖^{2*}, 芦易¹, 李嫣红¹, 阳玉婷¹, 谢念佳¹

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)探究芍药汤对2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)大鼠的粪便代谢产物的影响。方法: 将SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、芍药汤组(11.1 g·kg⁻¹), 除正常组外, 采用TNBS诱导UC大鼠模型, 除芍药汤组外, 各组分别予以生理盐水, 均治疗7 d, 观察各组大鼠一般情况和疾病活动指数(DAI), 采用苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学改变, 免疫组化法(IHC)检测结肠组织中白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-22(IL-22)蛋白表达, 采用LC-MS技术检测大鼠粪便样本, 并通过主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)分析数据, 对筛人体代谢组数据库(HMDB)数据库及京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库, 结合文献筛查, 筛选差异代谢物, 结合Metabo Analyst 5.0检索, 得到通路富集分析。结果: UC大鼠灌胃芍药汤可使DAI评分降低, 与正常组比较, 模型组大鼠结肠黏膜结构破坏, 黏膜下层炎性细胞浸润, 结肠组织IL-8蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), IL-22蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), 与模型组比较, 芍药汤组大鼠结肠损伤减轻, 结肠组织IL-8蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), IL-22蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。经过筛选处理, 与模型组比较, 芍药汤组共鉴定出15个差异代谢物, 代谢物主要涉及通路包括不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢、萜类骨架生物合成、卟啉和叶绿素代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、嘧啶代谢、类固醇激素生物合成。结论: 芍药汤对UC具有治疗作用, 其抗炎作用可能与改善脂质代谢、调节辅因子和维生素代谢、碳水化合物代谢的异常状态有关。

[关键词] 芍药汤; 溃疡性结肠炎; 代谢组学; 非靶向

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0061-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230201 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230104.2113.007.html>

[网络出版日期] 2023-01-05 16:04:01

Effect of Shaoyaotang on Fecal Metabolites in Rats with Ulcerative Colitis Based on Liquid Chromatography-mass Spectrometry

LIU Xingci¹, WU Dongsheng², CAO Hui^{2*}, LU Yi¹, LI Yanhong¹, YANG Yuting¹, XIE Nianjia¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shaoyaotang on fecal metabolites in rats with ulcerative colitis (UC) induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Method:** Male SPF SD rats were randomly divided into normal group, model

[收稿日期] 2022-08-17

[基金项目] 湖南省“神农人才”工程第一批中医药学科带头人培养计划项目(2022);湖南省中医药科研计划项目(2021022, B2023030);长沙市自然科学基金项目(kq2014221);湖南省卫生健康委科研课题(202204134275, B202304138985);湖南省教育厅科学研究重点项目(19A373)

[第一作者] 刘星赐, 硕士, 医师, 从事肠道慢性疾病合并肛周病变的中医药研究, Tel: 0731-89669129, E-mail: 247573274@qq.com

[通信作者] *曹晖, 硕士, 主任医师, 从事中医药防治肠道慢性疾病合并肛周病变的研究, Tel: 0731-89669129, E-mail: Caohui001818@sina.com

group and Shaoyaotang group ($11.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Except for normal group, UC rat model was induced by TNBS, and each group was given normal saline except Shaoyaotang group. All groups were treated for 7 days, and the general condition and disease activity index (DAI) were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of colon, and the protein expressions of interleukin-8 (IL-8) and interleukin-22 (IL-22) in colon tissue were detected by immunohistochemistry (IHC). Rat fecal samples were detected by LC-MS, and the data were analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Human Metabolome Database (HMDB) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were searched to screen differential metabolites in combination with literature reference. Then, pathway enrichment analysis was conducted using Metabo Analyst 5.0. **Result:** Shaoyaotang (*ig*) decreased the DAI of UC rats. Compared with the normal group, the model group had damaged colonic mucosa structure, submucosal inflammatory cell infiltration, increased protein expressions of IL-8 ($P < 0.01$) and IL-22 ($P < 0.05$) in colon tissue. Compared with the conditions in the model group, the colonic damage was alleviated in the Shaoyaotang group, and the protein expressions of IL-8 and IL-22 in colon tissue were decreased ($P < 0.01$). After screening, 15 differential metabolites were identified from the Shaoyaotang group, and the involved pathways mainly included biosynthesis of unsaturated fatty acids, linoleic acid metabolism, terpenoid backbone biosynthesis, porphyrin and chlorophyll metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, pyrimidine metabolism and steroid hormone biosynthesis. **Conclusion:** Shaoyaotang has a therapeutic effect on UC, and its anti-inflammatory effect may be related to improving lipid metabolism and regulating the metabolism of cofactors and vitamins as well as the abnormal carbohydrate metabolism.

[Keywords] Shaoyaotang; ulcerative colitis; metabolomics; non-targeted

溃疡性结肠炎(UC)是一种常见的慢性炎症性肠病,临床表现主要以反复腹痛、腹泻、泻下黏液脓血便、体质减轻为主^[1]。近年来,UC的发病率在国内外都呈明显上升趋势^[2],对人类生产生活造成了严重的影响。UC的发病机制尚未明确,临床上暂未发现满意的治疗策略,目前西医常见的治疗包括皮质类固醇、免疫抑制剂和生物疗法等,但这种方法只能暂缓病情且不良反应明显^[3]。中医药作为祖国传统医药,具有多靶点、多途径的治疗特点,在治疗UC方面具有显著的优势。

芍药汤出自金代医家刘完素《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,全方位围绕“通因通用”的治法,清解中兼以健脾利湿、涩肠导滞、调气凉血,使热清湿化,气行血活,积滞得下,诸症自解,芍药汤在临床上疗效明显,是临床中医药治疗UC的特色代表方之一^[4]。本课题组对芍药汤治疗UC开展了长期的临床及基础研究,前期研究发现,芍药汤可以改善UC大鼠结肠组织病理变化及机体免疫功能^[5],芍药汤可以抑制低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的激活,从而调整炎症因子的平衡^[6],此外还证明芍药汤能有效逆转UC大鼠肠道菌群失衡状态,增加益生菌,降低致病菌和条件致病菌的含量^[7],并提高UC大鼠肠道菌群的丰度与多样性,调整其肠道菌群紊乱的状

态,从而减轻炎症^[8]。根据前期研究基础,芍药汤治疗UC的相关代谢组学研究尚不充分,为进一步探究UC在芍药汤作用下粪便代谢产物的变化,本实验对芍药汤治疗UC展开了粪便代谢组学研究。

代谢组学是系统生物学中重要的分支,非靶向代谢组学即无偏向地检测样本中所有能检测到的代谢物分子的变化,并通过生信分析筛选差异代谢物,对差异代谢物进行通路分析,揭示其变化的生理机制^[9]。本研究采用液相色谱与质谱联用技术(LC-MS),以UC大鼠粪便为例,通过对比分析正常组、模型组和芍药汤组UC大鼠的粪便差异性代谢物,鉴定并寻找潜在生物标志物和靶点,进一步探讨芍药汤干预UC的代谢途径和特征,为芍药汤的作用机制研究与临床应用提供参考,从而为UC的防治提供新思路。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性SD大鼠(SPF级),22只,体质量150~170 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(湘)2019-0004,动物质量合格证编号430727211101295026。分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度24~26℃,湿度50%~70%,噪声、明暗循环的环境中,大鼠自由摄食和饮水,以蒸馏水及标准饲料

饲养3 d以适应环境。本实验在实验动物有关条例的规范下进行。湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理批准号ZYFY20210615。

1.2 药物 芍药汤由白芍30 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号TH22071607),黄芩15 g(湖南三湘中药饮片有限公司,批号2022071104),黄连15 g(安徽贵仁中药饮片有限公司,批号21070110),大黄9 g、槟榔6 g、木香6 g、炙甘草6 g(长沙新林制药有限公司,批号分别为220401、220305、220701、220602),当归15 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号TH22062710),肉桂5 g(亳州市沪谯药业有限公司,批号2204150082)组成,购于湖南中医药大学第一附属医院药剂科,经湖南中医药大学第一附属医院邓桂明副主任药师鉴定,中药冷水浸泡30 min后,水煎2次,经浓缩、滤过等处理,形成1 mL药液含生药量1.1 g,置于4 °C冰箱储存备用。

1.3 试剂 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、戊巴比妥钠粉末、甲酸(美国Sigma公司,批号分别为SLBX3263、57-33-0、64-18-6);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0105);兔抗鼠白细胞介素-8(IL-8)抗体(英国AAB公司,批号A16260);IL-22抗体(北京博奥森生物公司,批号bs-2623R);粪便隐血检测试纸试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号B210501);甲醇、乙腈(LC-MS级纯,美国Honeywell公司,批号分别为67-56-1、75-05-8)。

1.4 仪器 TG16W型微量高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);RM2235型精密轮转切片机(德国Leica公司);KD-BM.BL型组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC型超高效液相、Q-Exact型高分辨质谱、Heraeus Fresco17型离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);BSA124S-CW型天平(德国Sartorius公司);明澈D24 UV型纯水仪(美国Merck Millipore公司);ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国Waters公司)。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 造模 沿用课题组TNBS法造模,制备UC大鼠模型^[6,8]。随机选取8只大鼠作为正常组,其余大鼠均参与造模。造模前大鼠禁食24 h,3%的戊巴比妥钠30 mg·kg⁻¹腹腔麻醉后,用石蜡润滑0.4 mm直径的聚乙烯软管,插入直肠深约8 cm,注入5%

TNBS 75 mg·kg⁻¹+50%乙醇0.25 mL,再将大鼠提尾倒置60 s,使药液充分停留结肠内,正常组予以等体积的生理盐水灌肠,清醒后自由饮水。造模7 d后,随机在正常组与造模组各抽取2只大鼠解剖观察,对比正常组,发现模型组大鼠结肠组织肉眼可见溃疡面,病检提示炎性改变,即造模成功^[10]。

2.1.2 分组及给药 除去正常组6只大鼠,将剩余12只大鼠按随机数字表法随机分为模型组、芍药汤组(11.1 g·kg⁻¹,沿用课题组前期实验给药浓度^[6]),每组各6只。造模成功后第2天,开始灌胃给药,所有药物采用蒸馏水溶解配制。按人体用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量。芍药汤组2 mL/次,1次/d;正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,1次/d,连续给药7 d。依据人和动物按体表面积折算的等效剂量比值,以临床治疗60 kg体质量的患者每日服按生药量计为107 g芍药汤为标准,与160 g大鼠体表面积折算动物1 d给药剂量。

2.1.3 动物取材及处理 灌胃给药7 d后,末次给药24 h后用3%戊巴比妥钠深度腹腔麻醉大鼠,无菌操作下剖腹;接负压采血管取腹主动脉血2 mL,离心后将血清分装,-20 °C避光保存,待检测备用。取血结束后处死大鼠,取病变肠道内的粪便标本2~3 g,置于-80 °C冰箱保存,粪便标本送至杭州联川生物技术股份有限公司进行非靶向代谢组学分析检测。于肛门处向上取结肠(8±2) cm处,剪取病变结肠组织约2 cm,纵向剖开,无菌生理盐水清洗,剪下0.5 cm肠组织进行HE染色,余部分置于-80 °C冰箱保存。

2.2 指标检测

2.2.1 一般情况及疾病活动指数(DAI)评分及粪便隐血检测 造模成功后每天观察大鼠毛发、精神、活动度、摄食摄水量、大小便等,记录体质量,观察粪便形态、分泌物,利用隐血试纸检测有无隐血,并根据大鼠DAI进行评分,评估造模后UC的严重程度^[11]。DAI=(体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。DAI评分标准见表1。

表1 DAI评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

体质量下降(%)	大便性状	肉眼血便	评分/分
<1	正常	正常	0
1~5	量少、硬、湿、黏	隐血(+)	1
6~10	量多、软、很黏	隐血(++)	2
10~15	量多、软、散	隐血(+++)	3
>15	稀便	肉眼血便(+++)	4

注:+,阳性强度(图1同)

2.2.2 HE染色观察结肠组织病理变化 将结肠组织置于4%多聚甲醛中固定,将组织浸入蜡中包埋后切片,进行苏木素染色,镜下观察其病理变化,进行病理组织学分级^[12]。0级,正常结肠;1级,黏膜固有层有少量中性粒细胞浸润,累及少量隐窝;2级,黏膜固有层有大量中性粒细胞浸润,伴隐窝脓肿;3级,固有层明显急性炎症伴溃疡形成。

2.2.3 免疫组化检测结肠组织中IL-8、IL-22蛋白表达 将结肠切片在二甲苯溶液中脱蜡,并在梯度递减的乙醇溶液中水化,然后用柠檬酸盐抗原修复溶液处理切片,用0.5% Triton X-100溶液透化20 min,用3% H₂O₂溶液孵育,用5%牛血清白蛋白封闭切片20 min,再与IL-8(1:500)、IL-22(1:500)在37℃下温育1 h, PBS洗涤后,将切片与羊抗兔IgG(1:1 000)在37℃温育20 min,经DAB显色、复染、脱水、透化、固定后,显微镜下观察,封片、拍照,以Image-Pro Plus软件测定积分吸光度IA和阳性表达面积,计算平均积分吸光度AA(积分吸光度/阳性表达面积)。

2.2.4 LC-MS检测

2.2.4.1 代谢物的提取 称取粪便100 mg样品进行液氮研磨。向样品加入50%甲醇0.12 mL震动混匀,提取样品中的代谢物,常温静置10 min。提取液放-20℃过夜,沉淀样品中的蛋白质。4 000 ×g离心20 min,转移上清液代谢物提取液到96孔板。每个样品等量取出0.01 mL稀释液混合成QC样品。所有代谢样品在上样前放-80℃冰箱保存。

2.2.4.2 仪器检测条件 液相条件为Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC, ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)。柱温35℃,流速为0.4 mL·min⁻¹。流动相为A相,水(0.1%甲酸);B相,乙腈(0.1%甲酸)。液相梯度设置见表2。

表2 流动相梯度洗脱条件

Table 2 Mobile phase gradient elution conditions

t/min	流动相成分
0~0.5	5%流动相B
0.5~7	5%~100%流动相B
7~8	100%流动相B
8~8.1	100%~5%流动相B
8.1~10	5%流动相B

质谱条件:高分辨率串联质谱仪Q-Exactive,采用ESI离子源,在正负离子模式下运行。以70 000

的分辨率收集前体光谱(*m/z* 70~1 050)以达到3 e⁶的AGC目标。最大进样时间设置为100 ms。在DDA模式下设置了获取数据的前3个配置。以17 500的分辨率收集碎片光谱以达到1 e⁵的AGC目标,最大进样时间为80 ms。

2.5 数据处理与统计分析 非靶向代谢组学部分利用Proteowizard的MSConvert软件将质谱下机原始数据转换成可读数据格式-mzXML。利用XCMS软件进行峰提取并进行质控,对提取到的物质利用CAMERA进行加和离子注释。利用MetaX软件进行代谢物鉴定(一级质谱信息进行数据库匹配鉴定,二级质谱信息与in-house标准品数据库进行匹配鉴定)。候选鉴定物质分别利用HMDB、KEGG等数据库进行代谢物注释,解释代谢物的物理化学性质、生物功能。结合主成分分析(PCA),采用单变量分析差异倍数和T检验,进行BH校正得到P值,结合偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)得到的差异贡献度Variable Important for the Projection(VIP)值,结合表达差异倍数ratio值,满足①ratio≥2或ratio≤1/2,②P_{value}<0.05,③VIP≥1此3个条件利用MetaX软件对代谢物进行定量、筛选差异代谢物。

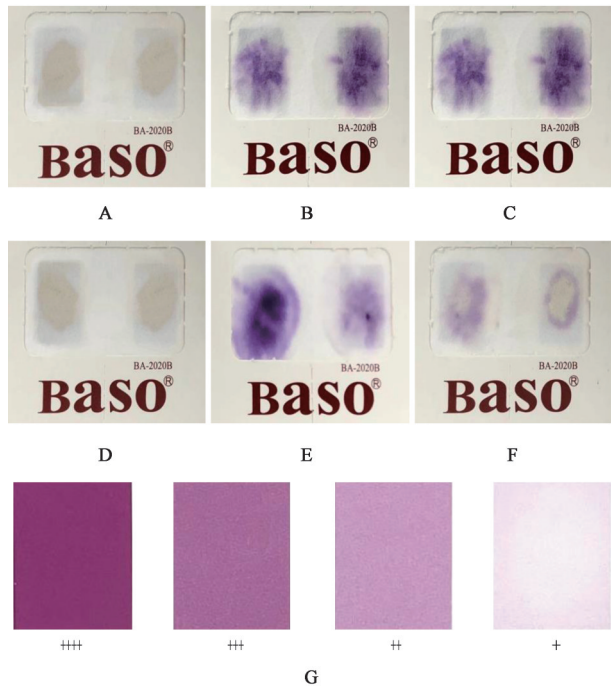
采用SPSS 22.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行正态性检验及方差齐性检验,若方差齐用方差分析,并进行组间多重比较;若方差不齐用非参数秩和检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模后UC大鼠隐血及DAI评分水平 正常组大鼠一般活动状态较好,造模组大鼠在造模后出现少动、毛发蓬乱、食少、便秘及脓血便的情况,予以粪便隐血试纸检测,见图1,可见造模组出现不同程度隐血。与正常组比较,UC模型组DAI评分升高(P<0.01);在给予芍药汤干预后,上述情况好转,与模型组比较,芍药汤组大鼠疾病活动指数降低(P<0.01),见图2。

3.2 对UC大鼠结肠组织病理学的影响 HE结果显示,正常组大鼠结肠组织黏膜镜下结构完好,排列规整;模型组大鼠结肠组织镜下显示大量炎细胞浸润,腺体破坏脱落呈不连续性;芍药汤组干预下,大鼠结肠黏膜结构完整性较好,炎性细胞浸润较少,破坏程度较模型组减轻,见表3、图3。

3.3 对UC大鼠结肠组织IL-8、IL-22蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠结肠组织IL-8蛋白表达水平显著升高(P<0.01),IL-22蛋白表达水平明



注:A.造模第7天正常组;B.造模第7天模型组;C.造模第7天芍药汤组;D.造模第14天正常组;E.造模第14天模型组;F.造模第14天芍药汤组;G.隐血评分指示卡

图1 UC大鼠粪便隐血检测(试纸法)

Fig. 1 Detection of fecal occult blood in UC rats (test strip method)

显升高($P<0.05$);与模型组比较,芍药汤组大鼠结肠组织IL-8蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),IL-22蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。见表4、图4、图5。

3.4 UC大鼠粪便代谢物的分析

3.4.1 UC大鼠粪便代谢物检测质控 采用LC-MS方法获得正负总离子流图(TIC)(见增强出版附加

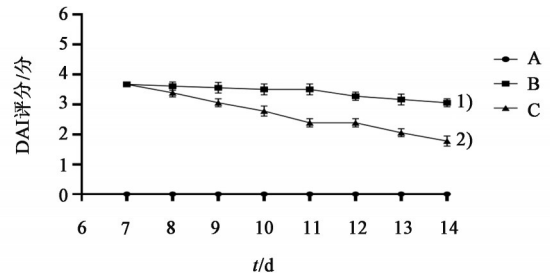
表3 芍药汤对UC大鼠病理损伤分级程度分布的影响($n=6$)

Table 3 Effect of Shaoyao Tang on distribution of pathological damage grades in UC rat ($n=6$)

只

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	病理损伤分级分布			
		0级,正常结肠,无损伤	1级,黏膜固有层有少量炎细胞浸润累及少量隐窝	2级,黏膜固有层有大量炎胞浸润,伴隐窝脓肿	3级,固有层明显急性炎症伴溃疡形成
正常组		6			
模型组			1	4	1
芍药汤组	11.1		4	2	

3.4.3 PLS-DA PLS-DA是一种有监督的差异判别分析方法,可以最大程度地反映不同组别之间的差异。见增强出版附加材料,正常组、模型组、芍药汤组各组区分明显,组间存在差异。 R^2 代表模型的解释率, Q^2 代表模型的预测率。正常组和模型组中,正离子模式下 R^2 为0.930, Q^2 为-0.159,负离子模式下 R^2 为0.899, Q^2 为0.029;芍药汤组和模型组中,



注:A.正常组;B.模型组;C.芍药汤组;与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$

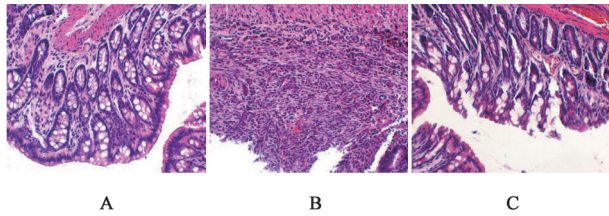
图2 大鼠DAI评分趋势($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 DAI score trend chart of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

材料),从TIC图中可以直观发现正常组、UC模型组、芍药汤组各组间存在差异。其中,正常组比较模型组中,鉴定到变化的正负离子共513个,芍药汤组比较模型组中,鉴定到变化的正负离子共375个。

3.4.2 PCA PCA可以从复杂多元的结果中筛选出主要影响因素,观察结果中的一般聚类、趋势或异常值,点的聚集表示观测变量具有高度的相似性,点的离散代表了观测变量有明显的差异性。见增强出版附加材料,PCA结果中,芍药汤组、空白组与模型组中组内样本平行性较好,组间分离较明显。正常组和模型组中,正离子模式下,第一主成分(PC1)为23.67%和第二主成分(PC2)为15.03%,累计贡献率为38.7%,负离子模式下,PC1为23.36%和PC2为16.61%,累计贡献率为39.97%;芍药汤组和模型组中,正离子模式下,PC1为23.9%和PC2为18.89%,累计贡献率为42.79%,负离子模式下,PC1为22.31%和PC2为19.54%,累计贡献率为41.85%;从整体上反映出这些样品具有一定的差异性。

正离子模式下 R^2 为0.839, Q^2 为-0.248,负离子模式下 R^2 为0.837, Q^2 为-0.347,证明各组模型较为可靠。对各组数据模型进行置换检验, R^2 、 Q^2 代表模型验证时是否存在过拟合,由置换检验图可得,正常组和模型组中,正离子模式下 Q^2 为-0.582,负离子模式下 Q^2 为-0.639;芍药汤组和模型组中,正离子模式下 Q^2 为-0.733,负离子模式下 Q^2 为-0.830,各组 $Q^2<$



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 芍药汤组(图4、图5同)
图3 芍药汤对于UC大鼠结肠组织病理变化的影响(HE, ×400)
Fig. 3 Effect of Shaoyao Tang on pathological changes of colon in UC rat (HE, ×400)

表4 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-8、IL-22蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Shaoyao Tang on expression of IL-8 and IL-22 in rats colon tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-8	IL-22
正常组		0.013±0.002	0.017±0.003
模型组		0.020±0.004 ¹⁾	0.025±0.008 ²⁾
芍药汤组	11.1	0.012±0.002 ³⁾	0.011±0.001 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与模型组比较³⁾ $P<0.01$

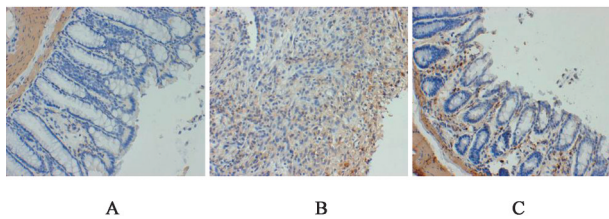


图4 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-8蛋白表达的影响(免疫组化, ×100)
Fig. 4 Effect of Shaoyao Tang on expression of IL-8 protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×100)

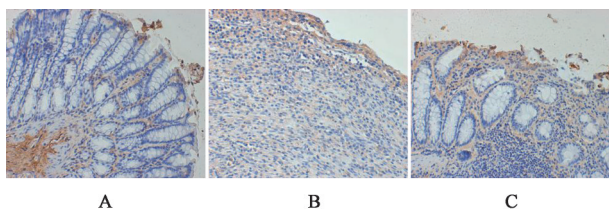


图5 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-22蛋白表达的影响(免疫组化, ×100)
Fig. 5 Effect of Shaoyao Tang on expression of IL-22 protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×100)

0, 且 R^2 在 Q^2 之上, Q^2 回归线与Y轴截距均 <0 , 说明模型不存在过拟合的情况, 差异代谢物分析比较准确。

3.4.4 差异代谢物的筛选 通过PLS-DA分析及置换检验图筛选差异代谢物, 结合表达差异倍数 $ratio \geq 2$ 或 $ratio \leq 1/2$; $P_{\text{value}} < 0.05$; $VIP \geq 1.3$ 三个条件, 经过筛选处理, 和模型组比较, 找到相关的差异代谢离子, 从火山图(见增强出版附加材料)可得出, 相对

于模型组, 芍药汤组差异代谢物中, 上调的差异代谢物(红色)较下调的差异代谢物(绿色)多。代谢物的相对丰度在不同组间存在差异(见增强出版附加材料)。给予芍药汤治疗后调控了潜在差异代谢物的趋势, 逆转了TNBS对这些差异代谢物的影响。将潜在的生物标志物分别注释到HMDB数据库及京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库, 结合文献筛查。在对筛HMDB数据库中查到, 笔者关注到, 对比模型组, 芍药汤组共鉴定出15个差异代谢物, 见表5。

3.4.5 差异代谢物通路的分析 将15个差异代谢产物KEGG ID代入Metabo Analyst 5.0网站, 检索进行通路富集分析, 设置影响值大于0.10, 结果分析得出共得到7条代谢通路, 分别为不饱和脂肪酸的生物合成(Biosynthesis of unsaturated fatty acids)、亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism)、萜类骨架生物合成(Terpenoid backbone biosynthesis)、卟啉和叶绿素代谢(Porphyrin and chlorophyll metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)、类固醇激素生物合成(Steroid hormone biosynthesis)。其中, 不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢、类固醇激素生物合成归属于脂质代谢; 氨基糖和核苷酸糖代谢归属于碳水化合物代谢; 卟啉和叶绿素代谢归属于辅因子和维生素的代谢; 萜类骨架生物合成归属于萜类和聚酮化合物的代谢; 嘧啶代谢归属于核苷酸代谢。本研究表明, 芍药汤在干预UC大鼠疾病发展过程中, 上述7条代谢通路受到影响(见增强出版附加材料)。其中, 通路富集分析表明, 芍药汤在调节不饱和脂肪酸的生物合成及亚油酸代谢, 即脂质代谢上富集较为明显($P<0.05$, 见增强出版附加材料), 差异代谢物结果分析表明, 芍药汤在调节不饱和脂肪酸的生物合成上呈现上调趋势; 芍药汤在调节亚油酸代谢呈现下调趋势。见表5。

4 讨论

UC是一种临床常见的慢性肠道炎症, 机制尚未明确, 治疗上目前没有满意的方案。目前, 已知肠道微生态在UC发生发展中起到关键作用, 而肠道微生态与宿主代谢物关系密切。由于大便中不仅含有人体自身代谢的产物, 也包含肠道菌群代谢的及细菌与宿主共代谢的产物, 因此利用代谢组学技术研究粪便中特定代谢物的变化可以全面地反应其对肠道微生物的影响。IL-22是大肠中的一种

表5 芍药汤组&模型组大鼠粪便差异代谢物

Table 5 Differential metabolites in feces of Shaoyao tang group and model group

序号	化合物	分子式	离子模式	KEGG ID	t_r /min	m/z	VIP	趋势	通路
1	尿胆素	C ₃₃ H ₄₂ N ₄ O ₆	负	C05794	4.31	590.309 58	2.04	↑	卟啉和叶绿素代谢
2	金雀异黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	负	C06563	4.54	270.052 2	1.42	↑	异黄酮生物合成
3	石胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	负	C03990	6.21	376.297 06	1.46	↑	次级胆汁酸生物合成
4	二十二碳六烯酸	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	正	C06429	4.55	328.238 47	1.72	↑	不饱和脂肪酸的生物合成
5	三萜类化合物	C ₃₂ H ₄₁ NO ₅	正	C20546	4.58	519.298 84	1.41	↑	卟啉二萜生物碱生物合成
6	(<i>r</i>)-5-二磷酸甲羟戊酸	C ₆ H ₁₄ O ₁₀ P ₂	负	C01143	0.91	308.005 81	1.78	↑	萜类骨架生物合成
7	胸苷 5'-磷酸	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₈ P	负	C00364	2.11	322.056 36	2.33	↑	嘧啶代谢
8	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	正	C07113	1.92	120.057 07	1.76	↑	乙苯降解
9	胆绿素	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₆	负	C00500	4.84	582.247 09	2.15	↑	卟啉和叶绿素代谢
10	鞣酮	C ₂₈ H ₄₈ O ₄	负	C15791	7.67	448.354 63	1.55	↑	油菜素内酯生物合成
11	2-花生四烯酸甘油	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	负	C13856	5.31	378.276 35	1.67	↑	神经活性配体-受体相互作用
12	氨基葡萄糖	C ₆ H ₁₃ NO ₅	正	C00329	0.87	179.078 33	1.67	↑	氨基糖和核苷酸糖代谢
13	皮质酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	负	C02140	5.22	346.217 35	2.27	↓	类固醇激素生物合成
14	13(<i>s</i>)-hotre	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	正	C16316	5.74	294.217 86	1.54	↓	α -亚麻酸代谢
15	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	负	C01595	7.96	280.239 8	1.86	↓	亚油酸代谢

可诱导细胞因子,IL-22的表达在健康状态下几乎无法检测到,但可以在炎症性肠病(IBD)等炎症条件下被诱导表达^[13-14]。本实验结果表明,芍药汤可明显降低UC大鼠疾病活动指数,有效减轻UC大鼠结肠黏膜损伤,抑制IL-8、IL-22等炎症因子,减轻肠道炎症。非靶向代谢组学结果中,经过筛选与鉴定,粪便样品中筛选出15种差异代谢物,结合通路富集结果与文献对筛,与UC具有相关性的潜在生物标志物主要包括二十二碳六烯酸、胆绿素、氨基葡萄糖、亚油酸、石胆酸、金雀异黄素,涉及不饱和脂肪酸的合成、氨基糖和核苷酸糖代谢、次级胆汁酸生物合成、卟啉和叶绿素代谢等生化过程。通过对比模型组和芍药汤组,提示芍药汤可能通过改善脂质代谢、调节维生素代谢和碳水化合物代谢的异常状态来对UC产生治疗作用。以下围绕部分差异代谢物通路展开讨论。

二十二碳六烯酸(DHA)是人体一种必须的多不饱和脂肪酸,抗氧化、降脂、抗炎作用明显,其代谢归属于不饱和脂肪酸的生物合成,即脂质代谢。研究表明,DHA能有效保持肠道菌群稳定与质量平衡^[15],DHA及其相关产物能够抑制促炎细胞因子IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6等的产生,从而减轻炎症反应^[16]。与此同时,研究发现DHA能增加肠道组织闭锁链接蛋白-1(ZO-1)和闭合蛋白(Occludin)蛋白的表达,DHA可通过改善紧密连接

蛋白的表达来改善其屏障功能^[17]。亚油酸(LA)属于不饱和脂肪酸,是人和动物营养中通过食物获取的必需脂肪酸Omega-6的一种,其代谢同样归属于不饱和脂肪酸的生物合成,即脂质代谢。有研究表明,LA能转化为花生四烯酸(AA),增加炎症期间形成的Omega-6终产物的比例,产生如发热、水肿、组织损伤等的炎症现象,在炎症的发展中发挥着重要作用^[18-20];人体摄入亚油酸的含量与增加患UC的几率直接相关^[21]。本研究结果得出,在芍药汤的干预下,UC大鼠粪便代谢物中DHA呈现上升、亚油酸呈现下降趋势,分析得出芍药汤可能通过上调DHA和亚油酸代谢通路,减少促炎细胞的产生,从而减轻UC症状,与课题组前期研究芍药汤对于修复肠上皮组织紧密连接,减轻炎症反应,保护肠黏膜机械屏障相符合^[22]。

胆绿素是一种由血红素分解形成的四吡咯水溶性化合物,其代谢归属于卟啉和叶绿素代谢,即辅因子和维生素代谢^[23]。研究证实,胆绿素能够通过抑制核转录因子(NF)- κ B的激活,下调促炎细胞因子[如Toll样受体4(TLR4)]和刺激抗炎细胞因子(如IL-10)的产生来减轻炎症^[24-25]。炎症刺激TLR4上调激活TLR4/髓样分化因子88(MyD88)/NF- κ B通路,从而促进UC的发展^[26-27]。有研究证实,芍药汤可通过调控TLR4/NF- κ B信号通路中TLR4、NF- κ B p65和IL-6 mRNA及蛋白的表达,抑制UC

病情的发展^[28]。金雀异黄酮作为一种具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化的天然异黄酮化合物^[29],其代谢归属于异黄酮生物合成,即其他次生代谢物的生物合成。研究表明,金雀异黄酮可通过抑制环氧合酶-2(COX-2)和髓过氧化物酶(MPO)来减少大鼠慢性三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎^[30-31]。金雀异黄酮影响T细胞,使M1型巨噬细胞的极化向M2型巨噬细胞倾斜,即减少M1型巨噬细胞数量,增加M2型占比,减少了炎症^[32]。本研究中,芍药汤组中UC大鼠粪便代谢产物中胆绿素、金雀异黄酮水平上调,通过差异代谢物的比较,推测芍药汤可能通过改变胆绿素的水平,调节卟啉和叶绿素代谢,下调如TLR4/MyD88等炎性信号通路,减轻炎症反应,或通过上调金雀异黄酮来减轻UC大鼠肠道炎症,而芍药汤与T细胞、巨噬细胞M1促炎表型、M2抗炎表型、炎症反应之间的关系,尚需进一步研究。氨基葡萄糖是一种天然氨基单糖,其代谢归属于氨基糖和核苷酸糖代谢,即碳水化合物代谢。相关研究表明,氨基葡萄糖可以减少NF- κ B下游因子表达,包括TNF- α 、IL-6、IL-8^[33-37]。此外,氨基葡萄糖能抑制TNF- α 激活IL-8的产生和细胞间黏附分子ICAM-1的表达,减少结肠细胞的炎症和损伤^[38]。因此,氨基葡萄糖可以抑制炎性因子的表达,有效的减轻炎症反应。本研究结果发现芍药汤组氨基葡萄糖水平较模型组呈上升趋势,分析芍药汤可能通过调节氨基糖和核苷酸糖代谢通路,即碳水化合物代谢,抑制相关炎性因子的表达,改善UC的症状。

中医药在治疗UC上效果明显,其中芍药汤是祖国医药中治疗大肠湿热证UC的经典方剂^[39]。方中黄芩、黄连均为苦寒药,均有清热燥湿、泻火解毒之效,是芍药汤的君药^[40]。实验研究表明,“黄芩-黄连”药对提取物能调节致病菌数量^[41],有效改善并维持肠道微生物稳态平衡^[42],与本课题组前期对芍药汤调控肠道菌群结论一致;同时,黄芩提取物通过抑制脂质过氧化物的形成及影响炎症介质的释放来抗炎^[43],与本实验研究发现芍药汤通过脂质代谢通路调控炎症相契合;有网络药理学推测出“黄芩-黄连”药对治疗UC是通过TNF通路、IL-17通路及Toll样受体信号通路等来实现的^[44],而本研究分析差异粪便代谢产物,通过分析潜在作用的代谢通路,分析出芍药汤可能通过调节脂质代谢通路中TNF- α 及辅因子和维生素代谢通路中Toll样受体的变化来调控炎症,与该网络药理学预测的通路靶点

吻合。综上所述,本研究表明芍药汤对UC具有治疗效果,能够有效改善UC大鼠结肠病理变化,本研究初次在大鼠中系统观察芍药汤对机体肠道代谢的调节作用,揭示了芍药汤能够对动物内源性代谢发挥明显的调节作用,其在临床中的疗效机制可能与调节机体的内源性代谢,特别是脂质代谢、调节辅因子和维生素代谢、碳水化合物代谢途径有关,为今后的研究芍药汤对宿主代谢的作用机制提供了数据基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HE W, LIU M, LI Y, et al. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer integrity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 857: 172456.
- [2] 周琼阁,王凯,席作武,等. 基于肠道微环境探讨中医药防治溃疡性结肠炎的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7): 222-229.
- [3] GEREMIA A, BIANCHERI P, ALLAN P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(1): 3-10.
- [4] 凌霄,李伟霞,李春晓,等. 芍药汤对湿热泄泻大鼠的炎性细胞因子与肠道菌群的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 16-24.
- [5] 曹晖,吴东升,张彧,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理变化及免疫功能的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(6): 59-63.
- [6] 吴东升,曹晖,张彧,等. 芍药汤通过抑制HIF-1 α 调节Th17/Treg平衡治疗溃疡性结肠炎[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16): 9-15.
- [7] 李令. 基于16srDNA高通量测序技术探究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2019.
- [8] 曹晖,吴东升,张彧,等. 基于高通量测序技术研究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(1): 61-66.
- [9] 刘佳星,李佳涵,杜晨晖,等. 经典名方酸枣仁汤对PCPA致失眠大鼠的血清代谢组学研究[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(6): 1632-1641.
- [10] 周亚妮,宋云. 2,4,6-三硝基苯磺酸诱导灌肠法建立炎症性肠病模型的实验研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(22): 2420-2423, 2436.
- [11] LAGISHETTY V, MISHARIN A V, LIU N Q, et al. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2423-2432.

- [12] 陈志国,黄俊. 美沙拉嗪口服联合灌肠治疗溃疡性结肠炎剂量选择[J]. 中国全科医学, 2008, 11(22): 2066-2067.
- [13] ANDOH A, ZHANG Z, INATOMI O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(3):969-984.
- [14] SUGIMOTO K, OGAWA A, MIZOGUCHI E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2):534-544.
- [15] WATSON H, MITRA S, CRODEN F C, et al. A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota [J]. *Gut*, 2018, 67(11): 1974-1983.
- [16] CALDER P C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man [J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(5):1105-1115.
- [17] 宗亚楠,匡重伸,郭向阳,等. 二十二碳六烯酸对脂多糖诱导脓毒症小鼠肠黏膜损伤的保护效应[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(6):805-808.
- [18] FERRER R, MORENO J J. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(4):431-438.
- [19] RAMSDEN C E, RINGEL A, FELDSTEIN A E, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2012, 87(4/5):135-141.
- [20] ZHANG W, CHEN Y, JIANG H, et al. Integrated strategy for accurately screening biomarkers based on metabolomics coupled with network pharmacology [J]. *Talanta*, 2020, 211: 120710.
- [21] TJONNELAND A, OVERVAD K, BERGMANN M M, et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: A nested case-control study within a European prospective cohort study [J]. *Gut*, 2009, 58(12): 1606-1611.
- [22] 陈大光,曹晖,李令,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织机械屏障及细胞因子的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(4):67-71.
- [23] WEGIEL B, OTTERBEIN L E. Go green: The anti-inflammatory effects of biliverdin reductase [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3:47.
- [24] 龚睿,蒋磊,宋宁,等. 胆绿素对脂多糖诱导小鼠 RAW264. 7 巨噬细胞 NLRP3 炎性体激活的作用 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(10):35-39.
- [25] MCDONNELL M C, MOHIUDDIN S S. *StatPearls* [M]. San Francisco: Treasure Island (FL), 2022.
- [26] YAO D, DONG M, DAI C, et al. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(10): 1595-1602.
- [27] RASHIDIAN A, MUHAMMADNEJAD A, DEHPOUR A R, et al. Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: The involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24(2/3):109-118.
- [28] 徐敏,王凤仪,赵党生,等. 芍药汤对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4, NF- κ B p65 和 IL-6 表达的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14):53-58.
- [29] 王红梅,付剑亮,张婷,等. 金雀异黄素对脂多糖诱导小胶质细胞炎症反应的抑制作用 [J]. 上海交通大学学报:医学版, 2019, 39(5):446-450.
- [30] VERDRENGH M, JONSSON I M, HOLMDAHL R, et al. Genistein as an anti-inflammatory agent [J]. *Inflamm Res*, 2003, 52(8):341-346.
- [31] SEIBEL J, MOLZBERGER A F, HERTRAMPF T, et al. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis [J]. *Eur J Nutr*, 2009, 48(4):213-220.
- [32] ABRON J D, SINGH N P, PRICE R L, et al. Genistein induces macrophage polarization and systemic cytokine to ameliorate experimental colitis [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0199631.
- [33] XU C X, JIN H, CHUNG Y S, et al. Chondroitin sulfate extracted from the *Styela clava* tunic suppresses TNF- α -induced expression of inflammatory factors, VCAM-1 and iNOS by blocking Akt/NF- κ B signal in JB6 cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(1):93-100.
- [34] 张馨心,周唯,陆金根,等. 基于网络药理学探讨红黄饮治疗溃疡性结肠炎的分子机制 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1):52-62.
- [35] SAKAI S, SUGAWARA T, KISHI T, et al. Effect of glucosamine and related compounds on the degranulation of mast cells and ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice [J]. *Life Sci*, 2010, 86(9/10):337-343.
- [36] YOMOGIDA S, HUA J, SAKAMOTO K, et al. Glucosamine suppresses interleukin-8 production and

- ICAM-1 expression by TNF-alpha-stimulated human colonic epithelial HT-29 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(2):205-211.
- [37] 张婷,施敏,廖陈敏,等. 痛泻要方治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展[J]. *世界中医药*, 2021, 16(10):1643-1648.
- [38] VANGSNESS C T JR, SPIKER W, ERICKSON J. A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis [J]. *Arthroscopy*, 2009, 25(1):86-94.
- [39] 张声生,沈洪,郑凯,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8):3585-3589.
- [40] 张红杰,陈常莲,华诗培,等. “黄芩-黄连”药对研究进展[J]. *江西中医药大学学报*, 2022, 34(3):120-124.
- [41] 徐君. 黄芩-黄连药对与肠道菌群的相互作用研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2014.
- [42] 李自辉,陈平平,王宇,等. 基于高通量测序技术的黄芩提取物对热证模型大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *中草药*, 2021, 52(2):422-431.
- [43] 李亚. 黄芩在急性湿疹治疗中的应用效果及药理分析[J]. *北方药学*, 2016, 13(8):48-48, 49.
- [44] 焦瑶,袁亚利,王乾皓,等. 基于网络药理学的黄芩-黄连治疗溃疡性结肠炎作用机制探讨[J]. *临床药物治疗杂志*, 2021, 19(7):48-54.

[责任编辑 周冰冰]