

· 药物代谢 ·

基于UPLC-Q-TOF-MS技术的白花蛇舌草干预 结肠炎相关结肠癌小鼠血清代谢组学分析

王淑¹, 王信², 孙萍^{2*}, 孟莹¹, 曹广尚², 周鹏², 杨培民^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的:研究白花蛇舌草(HDW)对结肠炎相关结肠癌(CAC)模型小鼠的干预作用,并探索其作用机制。方法:采用致癌剂氧化偶氮甲烷(AOM)与致炎剂葡聚糖硫酸钠(DSS)协同作用建立CAC小鼠模型,通过疾病活动指数(DAI),结肠组织形态、病理损伤评分及成瘤率评价HDW对CAC小鼠的干预作用;采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)技术,结合多元统计分析方法,对小鼠血清进行代谢组学分析,探讨HDW干预CAC的作用机制。结果:HDW可以显著改善CAC小鼠一般状况,降低DAI,结肠大体形态和组织病理学评分、成瘤率显著降低。与正常组相比,模型组筛选得到差异代谢物38种,其中包括潜在生物标志物11种,涉及主要代谢通路11条;HDW可显著调节模型组差异代谢产物9种[烟酰胺,尿苷,4-吡哆酸,溶血磷脂酰胆碱(18:0),溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/20:0),肌肉肌醇,嘌呤,二氢鞘氨醇-1-磷酸,十四烷二酸],其中包括潜在生物标志物2种(肌肉肌醇、烟酰胺),可调控烟酸盐和烟酰胺代谢、肌醇磷酸盐代谢。结论:HDW对CAC具有治疗作用,其机制可能与调节能量代谢和糖代谢有关。

[关键词] 代谢组学; 白花蛇舌草; 差异代谢物; 生物标志物; 代谢通路; 结肠炎相关癌; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657.6;R96 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)06-0094-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202053

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200804.1355.003.html>

[网络出版日期] 2020-8-4 14:08

Serum Metabonomics Analysis of Colitis Associated Cancer Mice Intervened by *Hedyotis diffusa* Based on UPLC-Q-TOF-MS

WANG Shu¹, WANG Xin², SUN Ping^{2*}, MENG Ying¹, CAO Guang-shang²,
ZHOU Peng², YANG Pei-min^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intervention of *Hedyotis diffusa* (HDW) on colitis associated cancer (CAC) model mice and explore its mechanism. **Method:** The CAC mouse model was established by synergistic action of azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). The intervention of HDW on CAC mice was evaluated by disease activity index (DAI), colonic tissue morphology, pathological injury score and tumorigenesis rate. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and multivariate statistical analysis were used to analyze the metabonomics of mice serum and to explore the mechanism of HDW intervention on CAC. **Result:** HDW could significantly

[收稿日期] 20200603(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773950,80274052);山东省自然科学基金项目(ZR2015HL116);山东省中医药科技发展计划项目(2017-083)

[第一作者] 王淑,在读硕士,从事靶向制剂及药物新剂型、新技术研究,E-mail:2896815226@qq.com

[通信作者] *孙萍,硕士,主任药师,从事靶向制剂及药物新剂型、新技术研究,E-mail:tsunping@163.com;

*杨培民,博士,教授,主任药师,博士生导师,从事中药新药及抗肿瘤机制研究,E-mail:jnympm7777@126.com

improve the general condition of CAC mice, decrease DAI, colon gross morphological score, histopathological score and tumorigenesis rate. Compared with the normal group, 38 kinds of differential metabolites were screened in the model group, including 11 potential biomarkers, involving 11 main metabolic pathways. HDW could significantly regulate 9 kinds of differential metabolites [niacinamide, uridine, 4-pyridoxic acid, LysoPC (18:0), LysoPE (0:0/20:0), myo-inositol, purine, sphinganine 1-phosphate and tetradecanedioic acid] in the model group, including 2 kinds of potential biomarkers (myo-inositol and niacinamide), and HDW could regulate nicotinate and nicotinamide metabolism and inositol phosphate metabolism. **Conclusion:** HDW has a therapeutic effect on CAC, which may be achieved by regulation of energy metabolism and glucose metabolism.

[Key words] metabonomics; *Hedyotis diffusa*; differential metabolites; biomarkers; metabolic pathways; colitis associated cancer; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS)

结肠炎相关结肠癌(CAC)是一种病因尚不清楚的炎性肠病发展成的结肠癌^[1-2],由慢性炎症长期持续、反复发作所致,目前无有效治疗方法,死亡率高达50%^[3],是近年医学领域研究的难点与热点。国内学者基于单一或几种基因的转录或蛋白表达水平对CAC的发病机制进行研究^[4-5],认为其分子机制与炎症反应、免疫微环境以及肠道菌群紊乱有关,然而,人作为一个完整系统,此类研究方式存在一定缺陷。代谢组学可对复杂体系从整体角度进行认知,为疾病的发生和治疗机制研究提供了新思路^[6-7]。

中药因多靶点、多效应、不良反应少等优势而备受肿瘤界关注,研究发现黄芪白术汤、黄芩汤、痛泻要方等中药复方可通过干预炎症因子及相关通路抑制炎症反应,进而影响CAC的发生与发展^[2,8-9]。白花蛇舌草(HDW)作为抗炎、抗肿瘤之要药,始载于《广西中药志》。其味苦、甘,性寒,具有利尿消肿、清热解毒、活血止痛的功效,临床上广泛用于胃肠炎症及各种癌症的辅助治疗,效果显著,但尚无对其治疗CAC作用机制的研究^[10]。本课题组前期已基于肠道菌群探讨了CAC的发病机制及HDW对其干预作用,在此基础上,本实验采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)技术的代谢组学方法,考察CAC模型小鼠血清中内源代谢物及代谢通路的变化,分析HDW对CAC模型小鼠血清中内源代谢物及代谢通路的影响,探讨HDW对CAC的作用机制,以期对CAC的诊断方法提供新的思路与理论依据,为HDW治疗CAC的作用机制深入研究奠定基础。

1 材料

ACQUITY型超高效液相色谱系统和Xevo G2型Q-TOF质谱仪(美国Waters公司),Concentrator

plus型真空浓缩仪和5810R型台式冷冻离心机(德国艾本德公司),Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司),BCD-197KA型低温冰箱(河南新飞电器有限公司),ST40R型低温离心机(美国Thermo公司),AE240型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

氧化偶氮甲烷(AOM)和葡聚糖硫酸钠(DSS)(美国MP Biomedicals公司,批号分别为S2839, A5486),水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号20151010),水为娃哈哈纯净水或自制超纯水,甲醇、甲酸及2-氯苯丙氨酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。HDW药材由山东中医药大学附属医院药学部提供,经山东中医药大学附属医院药学部张学顺教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草*Hedyotis diffusa*的干燥全草。

清洁级C57BL/6J小鼠,雄性,体质量(20±2)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)2014-0007。置于山东中医药大学附属医院SPF级动物实验室饲养,相对湿度55%,动物室室温(25±2)℃及12h昼夜交替,分笼饲养,自由饮水、进食。本文所涉及的动物实验经山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准,批准号AWE-2019-053。

2 方法

2.1 HDW煎剂的制备 仿照《中药饮片标准汤剂(第一卷)》的中药饮片临床汤剂的使用方法,取HDW药材粉碎,过4号筛,称取适量置于圆底烧瓶中,加10倍量水回流提取2次,提取时间分别为40, 30 min,滤过,合并2次提取液,减压浓缩药液至生药质量浓度2 g·mL⁻¹,4℃储存备用。

2.2 动物模型的建立 取小鼠在SPF环境下适应性饲养7d,随机将其分成正常组和实验组,实验组

小鼠第1天予以腹腔注射AOM(10 mg)1次,1周后连续饮用2% DSS 7 d,随后饮用蒸馏水14 d,上述DSS/蒸馏水循环3次(后2次为1.5% DSS 5 d+蒸馏水16 d),正常组小鼠于腹腔注射AOM同体积的生理盐水,后正常饮食喂养。造模结束后,根据实验组小鼠的一般情况筛选造模成功小鼠,并从中随机抽取2只,处死后取结肠,进行结肠大体形态观察和组织切片观察,证明造模是否成功。所有小鼠均予正常饮食,每天于同一时间进行体质量称量,并做好记录。

2.3 动物模型的分组及给药 取正常组小鼠6只;取实验组中造模成功小鼠18只,随机分成3组,每组6只,分别为模型组和HDW低、高剂量组。HDW低、高剂量组分别按25,50 g·kg⁻¹灌胃HDW水煎液15 d。每天于同一时间进行体质量称定,末次给药后,各组停止进食,正常饮水。24 h后对小鼠进行摘眼球取血,取血后处死,取小鼠结肠,于-80℃保存。

2.4 血清样本采集及处理 末次给药24 h后对小鼠进行摘眼球取血,室温静置30 min后离心(转速12 000 r·min⁻¹,4℃,15 min,离心半径12 cm,下同),取血清,于-80℃保存。分析前将血清样本置于室温解冻,用移液枪吸取血浆样本100 μL置于1.5 mL离心管中。加入甲醇300 μL和内标(质量浓度为3.0 g·L⁻¹的2-氯苯丙氨酸)10 μL。涡旋混匀30 s后置于离心机中,离心处理。精密吸取上清液200 μL,转入进样小瓶中待测。取上述各小鼠血清样本10 μL混合得到质量控制(QC)样本,按上述方法备样。在样品分析前,连续检测6个QC样本,在样品分析过程中,每进10针样品进1针QC样品,以检验系统的稳定性与重复性。

2.5 小鼠一般状况、疾病活动指数及成瘤率 实验期间每天观察小鼠一般情况,包括体质量、毛色、活动、粪便等。实验结束后处死小鼠,取出小鼠结肠,沿肠纵行剖开,用生理盐水清洗。观察结肠大体形态,记录瘤体状况,计算成瘤率和小鼠疾病活动指数[DAI,DAI=(体质量下降分数+粪便性状分数+隐血分数)/3]^[11]。评分标准为体质量下降率0记0分,下降率1%~5%记1分,下降率6%~10%记2分,下降率11%~15%记3分,下降率>15%记4分;粪便性状正常记0分,松软记2分,腹泻记4分;血便情况正常记0分,隐血记2分,血便记4分。

2.6 小鼠结肠大体形态和组织形态病理变化 取小鼠结肠,纵剖,生理盐水清洗,解剖镜大体形态观察,根据其病理变化进行炎症评分(评分标准为充

血、出血、狭窄、溃疡、黏液、腹泻和粘连,出现以上每一项加1分)和黏膜息肉评分(评分标准为0个孤立息肉为0分,1~3个孤立息肉为1分,4个及以上孤立息肉为2分,息肉融合成片或块状为3分)^[12]。而后用4%多聚甲醛固定24 h,取出后冲洗固定液,逐步脱水2 h。用二甲苯溶液,进行透明处理;用65℃溶化的石蜡进行包埋处理。石蜡冷凝后,切片,用二甲苯进行脱蜡处理。切片先采用苏木素溶液染色,后采用0.5%伊红水溶性染色。染色后切片用二甲苯溶液处理至变为透明,滴上中性的树脂,盖上盖玻片,进行封固,对切片组织进行观察,计算组织病理学评分^[12]。评分标准设定为隐窝正常记0分,杯状细胞减少记1分,分支状、不规则、隐窝腔扩张记2分,萌芽复合体记3分;上皮正常记0分,过度增生或畸形隐窝病灶记1分,轻度不典型增生记2分,高度不典型增生记3分;无黏膜下浸润记0分,有黏膜下浸润记1分。

2.7 色谱条件 采用ACQUITY UPLC C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.5 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液梯度洗脱(0~2 min,95%A;2~13 min,95%~5%A;13~16 min,5%A),柱温40℃,流速0.4 mL·min⁻¹,进样量4 μL,自动进样器温度4℃。

2.8 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式,毛细管电压4 kV(ESI⁺)和3.5 kV(ESI⁻),干燥气流量11 L·min⁻¹,气体温度350℃,雾化气压力0.31 MPa,毛细管出口电压120 V,采集范围 m/z 100~1 000。质谱采集过程中同时打入参比离子用于监测质量轴的准确性,正离子模式为121.050 9,922.009 8;负离子模式为119.036 3,966.000 7。

2.9 数据处理 对原始质谱数据进行处理后导入SIMCA 14.1软件,对其进行主成分分析(PCA),偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),根据变量重要性投影(VIP)值>1,S-plot图及 t 检验 $P>0.05$ 筛选差异代谢物。筛选出的差异代谢物通过METLIN,人类代谢组数据库(HMDB)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行指认和鉴定。通过MetaboAnalyst 4.0和KEGG进行代谢通路的富集和构建,从差异代谢物中筛选潜在生物标志物。采用GraphPad Prism 8.0.1软件进行绘图,SPSS 21.0进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较用独立 t 检验,实验数据

以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况观察 正常组小鼠活动、皮毛、体质量和粪便情况均正常;模型组小鼠精神萎靡、脱毛、体质量显著下降($P<0.01$),出现便血现象;低、

高剂量 HDW 干预后,小鼠精神状态有所好转,体质量显著回升($P<0.01$),便血现象明显减轻,且 HDW 高剂量组小鼠恢复状态优于低剂量组。提示 HDW 对 CAC 模型的临床症状具有改善作用,且 HDW 高剂量组改善作用优于低剂量组。见表 1。

表 1 HDW 对 CAC 模型小鼠的影响($n=6$)

Table 1 Effect of HDW on CAC model mice ($n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	体质量($\bar{x}\pm s$)/g	DAI($\bar{x}\pm s$)/分	成瘤率/%	炎症评分($\bar{x}\pm s$)/分	黏膜息肉评分($\bar{x}\pm s$)/分	组织病理学评分($\bar{x}\pm s$)/分
正常		23.80±0.61	0	0	0.33±0.52	0.17±0.41	0.17±0.41
模型		18.76±1.39 ¹⁾	3.17±1.17 ¹⁾	100.00 ¹⁾	5.17±0.75 ¹⁾	1.50±0.55 ¹⁾	4.67±0.82 ¹⁾
HDW	25	20.97±0.98 ³⁾	0.67±0.52 ³⁾	66.67 ³⁾	2.33±0.52 ²⁾	0.83±0.41 ³⁾	1.83±0.41 ³⁾
	50	21.31±0.96 ³⁾	0.50±0.55 ³⁾	50.00 ³⁾	1.50±0.55 ³⁾	0.67±0.52 ³⁾	1.67±0.52 ³⁾

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

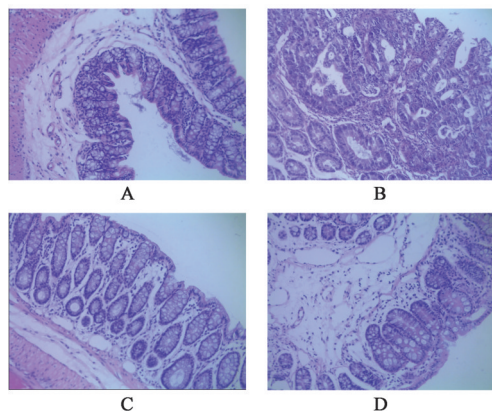
3.2 小鼠的 DAI 和成瘤率 由表 1 可知,与正常组相比,模型组小鼠 DAI 及成瘤率显著升高($P<0.01$);与模型组相比,HDW 低、高剂量组小鼠 DAI 及成瘤率显著降低($P<0.01$),且 HDW 高剂量组降低幅度大于低剂量组。提示 HDW 对 CAC 模型小鼠具有一定治疗作用,且 HDW 高剂量组的治疗作用优于低剂量组。

3.3 小鼠结肠大体形态和组织病理观察 解剖镜大体观察发现,正常组小鼠结肠形态正常,肠壁光滑湿润,有光泽;模型组小鼠结肠出现不同程度水肿、出血、溃疡、粘连,且肠道有息肉样异常隆起;给予低、高剂量 HDW 治疗后,小鼠结肠以上病理现象明显减轻,息肉数量减少或消失,且 HDW 高剂量组改善效果优于低剂量组。由表 1 可知,模型组炎症、黏膜息肉评分显著高于正常组($P<0.01$),HDW 作用后明显回调($P<0.05$, $P<0.01$),且 HDW 高剂量组回调度高于低剂量组。由图 1 可知,正常组小鼠结肠上皮细胞排列紧密,肠黏膜完整无明显异常;模型组小鼠结肠隐窝结构破坏,上皮细胞排列紊乱,形态各异,核质比增加,有不典型增生及炎性细胞浸润现象;低、高剂量 HDW 作用后,小鼠的隐窝结构紊乱、细胞增生、炎性浸润等现象较模型组减轻。模型组组织病理学评分显著高于正常组($P<0.01$),低、高剂量 HDW 作用后显著降低($P<0.01$),且 HDW 高剂量组降低幅度大于低剂量组。

3.4 总离子流色谱图 对正常组、模型组和 HDW 低、高剂量组小鼠血清正、负离子模式下的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流色谱图进行分析,结果发现各组样品总离子流色谱图基本相似,但各组峰型及峰面积存在一定差异,表明小鼠体内部分代谢物发生

变化,色谱峰保留时间主要集中在 0~15 min,具体指认结果见表 2,总离子流色谱图见图 2。

3.5 代谢轮廓分析 为获得可靠且高质量的代谢组学数据,对 QC 样本进行 PCA,见图 3。结果发现正、负离子模式下 QC 样本聚集在一起,表明系统较为稳定。PLS-DA 为有监督模式识别方法,可区分组间差异, R^2 和 Q^2 为该模型评价指标,分别代表其可解释度和预测能力。模型组与正常组进行 PLS-DA 分析,其 ESI⁺ 模式下 $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.852$; ESI⁻ 模式下 $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.868$,表明模型的可解释度与预测能力良好。由图 4(A, C) 可知,模型组与正常组各自聚为一类,代谢轮廓明显区分,表明小鼠体内代谢物代谢紊乱,提示造模成功。模型组与 HDW 低、高剂量组进行 PLS-DA 分析,其 ESI⁺ 模式下 $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.853$, ESI⁻ 模式下 $R^2Y=0.998$, $Q^2=0.889$,表明模型的可解释度与预测能力均良好。由



A. 正常组; B. 模型组; C. HDW 低剂量组; D. HDW 高剂量组
图 1 各组小鼠结肠组织病理变化情况(HE, ×200)

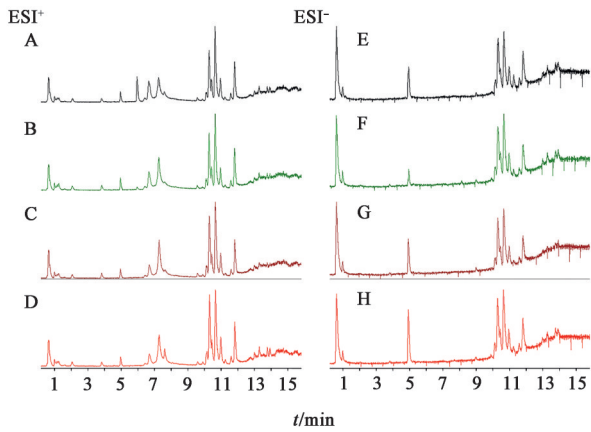
Fig. 1 Pathological changes in colon tissue of mice from four groups (HE, ×200)

表2 CAC模型小鼠血清中差异代谢物分析

Table 2 Analysis of differential metabolites in serum of CAC model mice

模式	差异代谢物	t_R /min	m/z	变化趋势	
				模型组/正常组	HDW高剂量组/模型组
正离子	肌酸 creatine	0.71	131.07	↓ ¹⁾	-
	L-胱氨酸 L-cystine	0.72	240.02	↓ ¹⁾	-
	花生四烯酸 arachidonic acid	13.18	304.24	↑ ¹⁾	-
	菜油甾醇 campesterol	13.10	400.37	↓ ¹⁾	-
	顺-9-棕榈油酸 cis-9-palmitoleic acid	13.04	254.22	↑ ¹⁾	-
	肌酸酐 creatinine	0.69	113.06	↓ ¹⁾	-
	甘氨酸 glycine	0.95	75.03	↓ ¹⁾	-
	酮亮氨酸 ketoleucine	11.27	130.06	↑ ¹⁾	-
	亚油酸 linoleic acid	13.29	280.24	↑ ²⁾	-
	溶血磷脂酰胆碱(18:0)lysoPC(18:0)	11.84	523.36	↑ ²⁾	-
	瓜氨酸 citrulline	0.73	175.10	↓ ¹⁾	-
	烟酰胺 niacinamide	1.09	122.05	↓ ²⁾	↑ ⁴⁾
	前列腺素 A ₂ prostaglandin A ₂ (PGA ₂)	7.47	334.21	↑ ¹⁾	-
	视黄醇 retinol	13.18	286.23	↑ ¹⁾	-
	二氢鞘氨醇-1-磷酸 sphinganine 1-phosphate	9.73	381.26	↑ ¹⁾	-
	鞘氨醇 sphingosine	13.18	299.28	↑ ¹⁾	-
	血栓素 B ₂ thromboxane B ₂ (TXB ₂)	7.46	370.24	↑ ¹⁾	-
尿苷 uridine	1.05	244.07	↑ ²⁾	↓ ³⁾	
负离子	4-吡哆酸 4-pyridoxic acid	0.73	183.05	↓ ¹⁾	↓ ³⁾
	arachidonic acid	13.18	304.24	↑ ¹⁾	-
	顺-11-二十碳烯酸 cis-gondoic acid	11.47	310.29	↑ ¹⁾	-
	高香草酸 homovanillic acid	3.88	182.06	↓ ¹⁾	-
	白三烯 A ₄ leukotriene A ₄	11.49	318.22	↑ ¹⁾	-
	linoleic acid	13.29	280.24	↑ ²⁾	-
	L-酪氨酸 L-tyrosine	1.12	181.07	↓ ¹⁾	-
	lysoPC(18:0)	11.83	523.36	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾
	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/20:0)lysoPE(0:0/20:0)	11.83	509.35	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾
	肌肉肌醇 myo-inositol	0.73	180.06	↓ ¹⁾	↓ ⁴⁾
	肉豆蔻酸 myristic acid	12.76	228.21	↑ ¹⁾	-
	油酸 oleic acid	13.93	282.26	↑ ²⁾	-
	前列腺素 A ₁ PGA ₁	13.17	336.23	↑ ¹⁾	-
	前列腺素 E ₃ PGE ₃	13.01	350.22	↑ ¹⁾	-
	嘌呤 purine	0.67	120.04	↓ ¹⁾	↓ ³⁾
	sphinganine 1-phosphate	9.79	381.26	↑ ¹⁾	↑ ³⁾
	硬脂酸 stearic acid	11.28	284.27	↑ ¹⁾	-
	十四烷二酸 tetradecanedioic acid	9.05	258.18	↑ ¹⁾	↓ ³⁾
	TXB ₂	7.50	370.24	↑ ¹⁾	-
	泛醌 Q ₂ ubiquinone Q ₂	13.79	318.18	↑ ²⁾	-
	黄嘌呤 xanthine	5.53	152.03	↑ ¹⁾	-
	黄嘌呤核苷 xanthosine	5.26	284.08	↑ ²⁾	-
	α-亚麻酸 α-linolenic acid	12.73	278.22	↑ ¹⁾	-
	3-吲哚-乳酸 indolelactic acid	5.73	205.07	↓ ¹⁾	-
	肾上腺酸 adrenic acid	13.82	332.27	↑ ¹⁾	-

注: ↑.含量上升; ↓.含量下降; -.含量无明显变化;与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01。



A, E. HDW 低剂量组; B, F. HDW 高剂量组; C, G. 正常组; D, H. 模型组

图2 不同离子模式下各组小鼠血清的UPLC-Q-TOF-MS总离子流

Fig. 2 Total ion chromatograms of mouse serum in each group under different ion modes by UPLC-Q-TOF-MS

图4(B, D)可知,模型组与HDW低、高剂量组代谢轮廓明显区分,且与HDW低剂量组相比,高剂量组距模型组更远,表明HDW对CAC模型小鼠血清代谢

物代谢紊乱具有调节作用,且HDW高剂量组调节作用强于低剂量组。

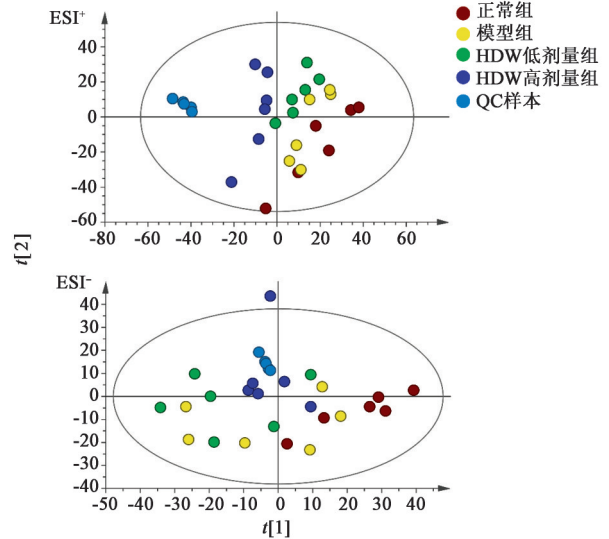
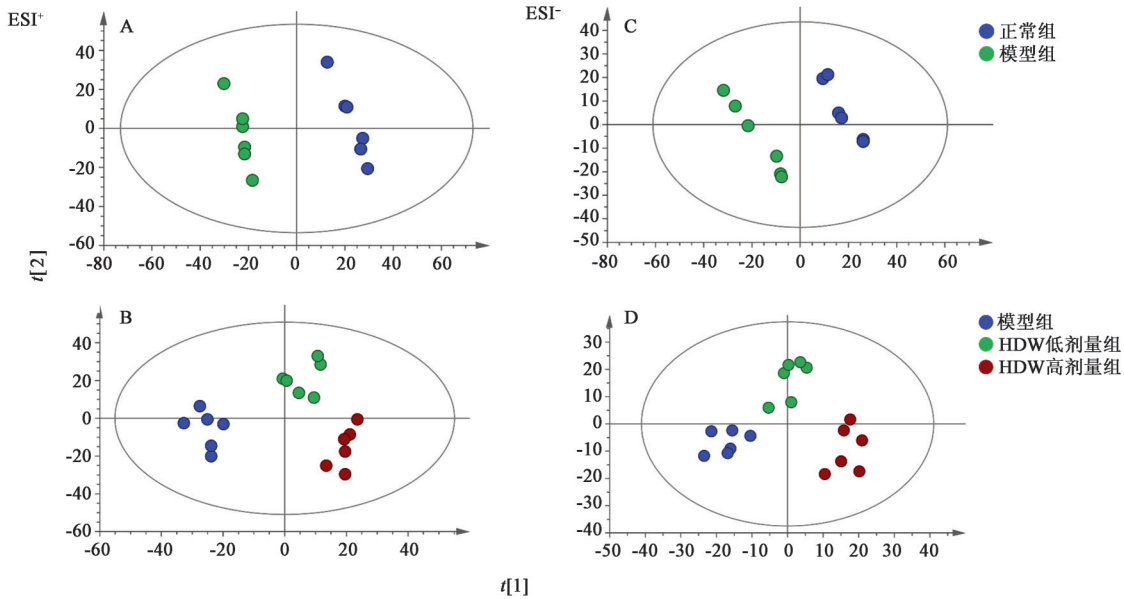


图3 不同离子模式下各组小鼠血清的PCA得分

Fig. 3 PCA scores of mouse serum in each group under different ion modes



A, C. 模型组与正常组; B, D. 模型组与HDW高、低剂量组

图4 不同离子模式下各组小鼠血清的PLS-DA得分

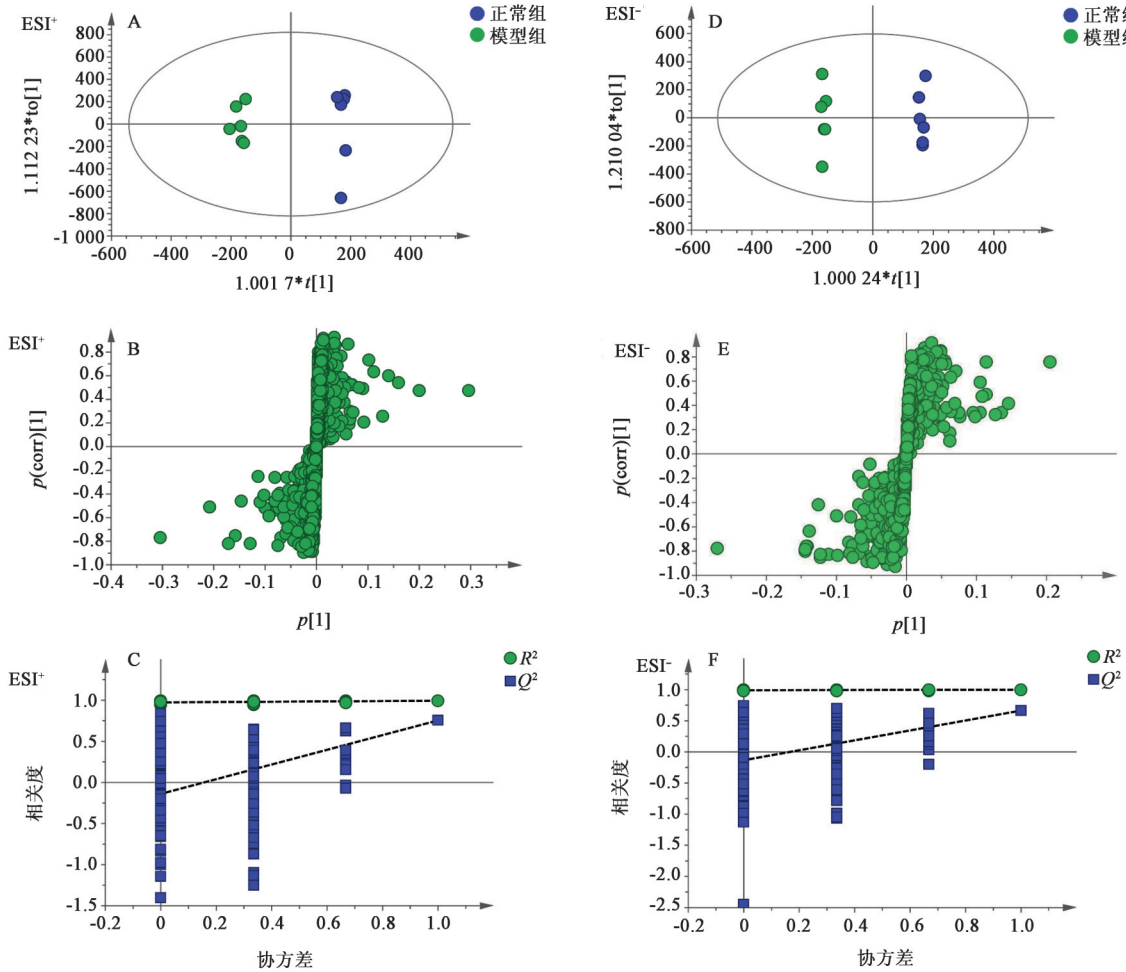
Fig. 4 PLS-DA scores of mouse serum in each group under different ion modes

3.6 血清差异代谢物的筛选 由于高剂量HDW对CAC小鼠血清代谢物代谢紊乱的调节能力更优,故又分别对模型组与正常组、模型组与HDW高剂量组分别进行OPLS-DA,筛选血清差异代谢物,见图5,6,得OPLS-DA得分图和S-plot图,并对模型进行验证,设定检验数为200次,且左边的 R^2 点和 Q^2 点均低于右边, Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以

下,表明未产生过分拟合,模型可靠。根据VIP值>1结合S-plot图,独立样本t检验($P<0.05$)筛选差异代谢物,结果与正常组相比,筛选得模型组差异代谢物38种(ESI^+ 模式18种, ESI^- 模式25种且有5种与 ESI^+ 模式重复);与模型组相比,HDW高剂量组可调节差异代谢物9种(ESI^+ 模式2种, ESI^- 模式7种),其中烟酰胺和二氢鞘氨醇-1-磷酸含量显著上调,尿

苷, 4-吡哆酸, lysoPC(18:0), lysoPE(0:0/20:0), 肌

肉肌醇, 嘌呤和十四烷二酸含量显著下调, 见表2。



A, D.得分图; B, E.S.-plot图; C, F.模型验证图(图6同)

图5 不同离子模式下模型组与正常组小鼠血清的OPLS-DA

Fig. 5 OPLS-DA of mouse serum in model group and normal group under different ion modes

3.7 潜在生物标志物筛选及代谢通路分析 将筛选得到的正常组比模型组的38种差异代谢物输入MetaboAnalyst 4.0中进行通路分析, 见图7。图中纵坐标轴为 $-\lg P$, 来自通路富集分析, 代表通路的显著性水平, P 越小即 $-\lg P$ 越大, 节点颜色越深; 横坐标轴为通路影响值(pathway impact), 来自通路拓扑分析, 代表代谢通路的影响程度重要性^[13], pathway impact越大, 节点半径越大。以 pathway impact > 0.1 为标准筛选主要代谢通路, 即潜在的靶标代谢路径^[14-15], 结果与正常组相比, 筛选得CAC模型潜在靶标代谢路径11条; 与模型组相比, HDW高剂量组可调节烟酸盐和烟酰胺代谢通路、肌醇磷酸盐代谢通路, 详见表3。将潜在靶标代谢路径涉及的差异代谢物作为潜在生物标志物, 结果与正常组相比, 得CAC模型潜在生物标志物11种, 其中亚油酸, 花生四烯酸, α -亚麻酸, 白三烯A₄和视黄醇含量显著

上调; 烟酰胺, 肌酸, L-酪氨酸, 甘氨酸, 瓜氨酸和肌肉肌醇含量显著下调; 与模型组相比, 高剂量HDW作用后可显著下调肌肉肌醇含量; 显著上调烟酰胺含量, 见图8。

4 讨论

本实验采用UPLC-Q-TOF-MS技术的代谢组学方法对CAC模型小鼠血清进行分析, 通过PCA, PLS-DA, OPLS-DA等多元统计分析方法筛选得到与CAC模型相关的差异代谢物38种, 通过MetaboAnalyst 4.0软件分析得到11条潜在靶标代谢通路和11种潜在生物标志物, 表明CAC的发生机制与能量代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、糖代谢的紊乱有关。高剂量HDW干预后CAC模型小鼠血清中9种差异代谢物发生显著变化, 其中潜在生物标志物肌肉肌醇含量显著下调, 烟酰胺含量显著上调, 促进了烟酸盐和烟酰胺代谢, 抑制了肌醇磷酸

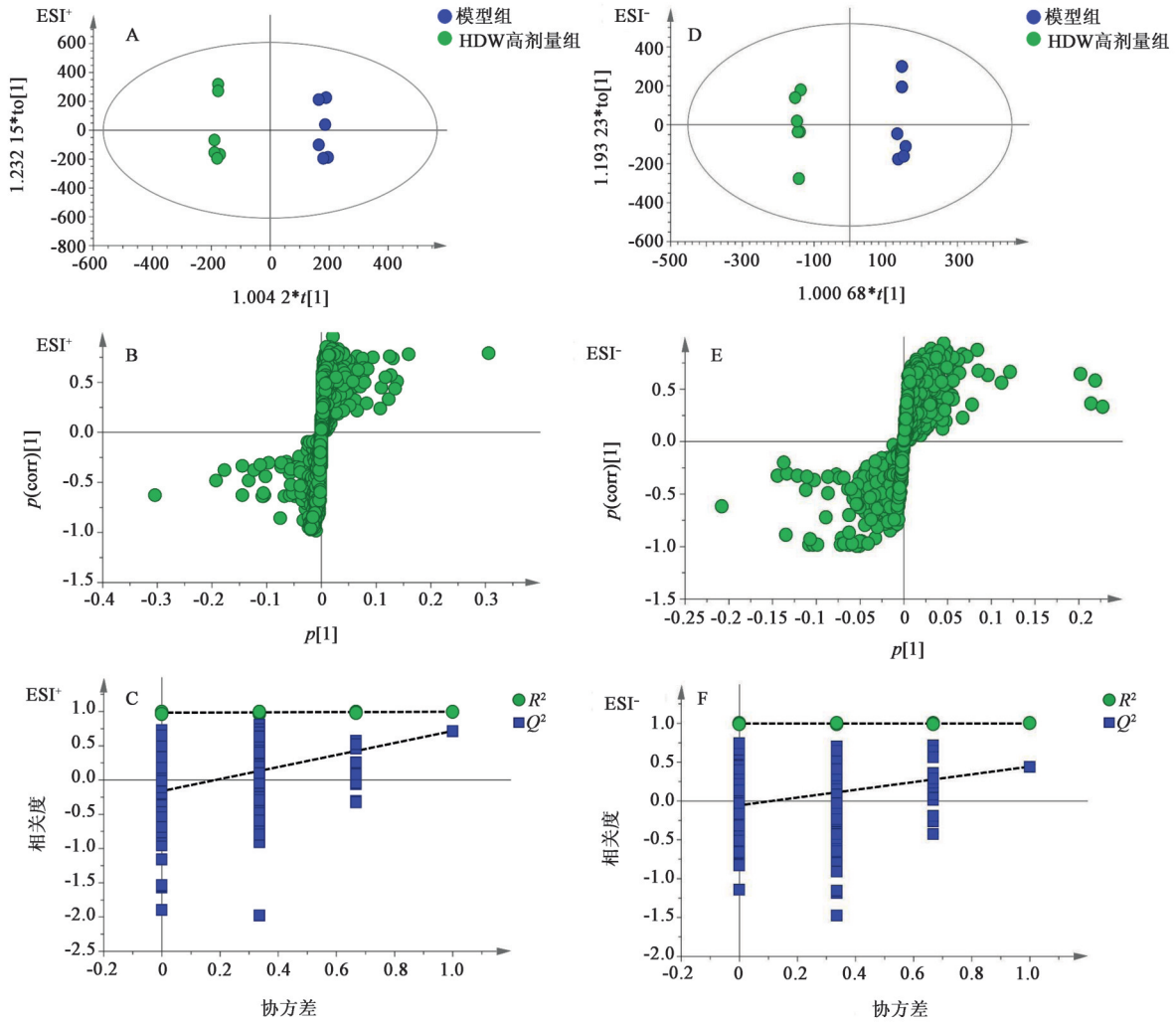
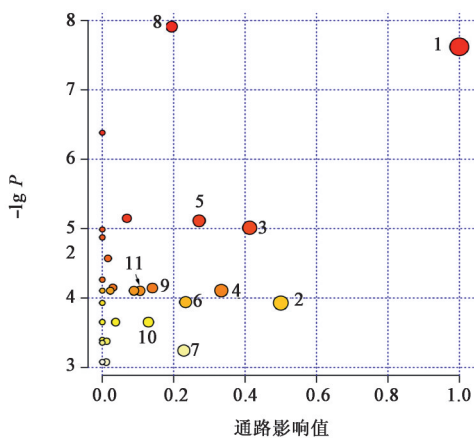


图6 不同离子模式下HDW高剂量组与模型组小鼠血清的OPLS-DA

Fig. 6 OPLS-DA of mouse serum in HDW high-dose group and model group under different ion modes



1. 亚油酸代谢; 2. 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成; 3. 花生四烯酸代谢; 4. α -亚麻酸代谢; 5. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 6. 视黄醇代谢; 7. 精氨酸生物合成; 8. 烟酸盐和烟酰胺代谢; 9. 酪氨酸代谢; 10. 肌醇磷酸盐代谢; 11. 乙醛酸和二羧酸代谢

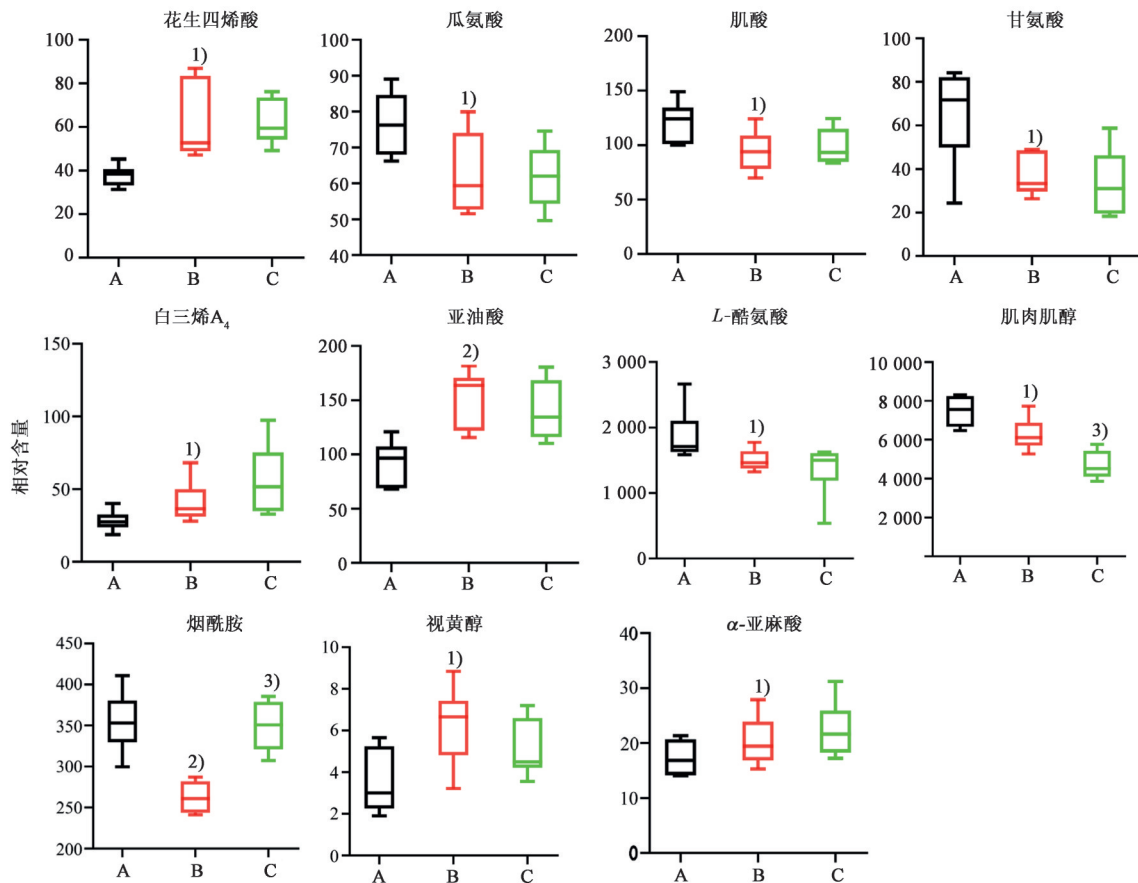
图7 CAC模型小鼠血清中差异代谢物的代谢通路富集

Fig. 7 Metabolic pathway enrichment of differential metabolites in serum of CAC model mice

表3 CAC模型小鼠的潜在靶标代谢路径

Table 3 Metabolic pathways of potential target in CAC model mice

编号	通路	通路影响值	化合物总数/个	匹配数/个
1	亚油酸代谢	1.000 0	5	1
2	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	0.500 0	4	1
3	花生四烯酸代谢	0.412 7	36	2
4	α -亚麻酸代谢	0.333 3	13	1
5	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	0.271 2	34	2
6	视黄醇代谢	0.233 5	16	1
7	精氨酸生物合成	0.228 4	14	1
8	烟酸盐和烟酰胺代谢	0.194 3	15	1
9	酪氨酸代谢	0.140 5	42	2
10	肌醇磷酸盐代谢	0.129 4	30	1
11	乙醛酸和二羧酸代谢	0.105 8	32	1



A. 正常组; B. 模型组; C. HDW 高剂量组; 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.01$

图8 正常组、模型组和 HDW 高剂量组小鼠血清中 11 个潜在生物标志物的相对含量

Fig. 8 Relative contents of 11 potential biomarkers in serum of mice from normal group, model group and HDW high-dose group

盐代谢,使机体能量代谢增加,糖代谢降低,从而抑制炎症反应,发挥对CAC的治疗作用。

4.1 能量代谢 涉及能量代谢的潜在生物标志物为烟酰胺、肌酸。肌酸由精氨酸、甘氨酸及甲硫氨酸合成,是重要的储能物质,可快速提供能量。烟酰胺是烟酸的酰胺形式,可参与能量代谢过程,与炎症反应密切相关^[16]。有研究表明烟酰胺可阻断炎症细胞活化,降低白细胞介素(IL)-1 β , IL-6, IL-8, 转化生长因子- β_2 (TGF- β_2)等炎性介质水平^[17]。模型组的烟酰胺、肌酸含量较正常组均降低,表明癌细胞的增殖需要大量能量,导致能量代谢异常,HDW作用后烟酰胺水平回调,表明HDW可能通过调节炎症因子及能量代谢发挥治疗作用。

4.2 脂类代谢 涉及脂类代谢的潜在生物标志物为亚油酸、花生四烯酸、白三烯A₄和 α -亚麻酸。花生四烯酸和亚油酸为 ω -6多不饱和脂肪酸,与结肠癌的发生和发展密切相关,为各种癌症的生物标志物,花生四烯酸的代谢产物白三烯是炎症反应介质,亚油酸还可通过影响其限速酶的表达抑制肿瘤

生长^[18]。 α -亚麻酸为 ω -3多不饱和脂肪酸,可在体内直接分解代谢,其代谢产物为机体细胞膜的组成成分,研究发现 α -亚麻酸能生成抑制白三烯B₄,肿瘤坏死因子- α (TNF- α), IL-1 β 等炎症因子释放的相关物质^[19],具有抑制炎症、提高机体免疫力的功能。模型组中亚油酸、花生四烯酸、白三烯A₄和 α -亚麻酸的含量较正常组均升高,表明CAC的发生可能与炎症的存在有关。

4.3 氨基酸代谢 涉及氨基酸代谢的潜在生物标志物为L-酪氨酸、甘氨酸、瓜氨酸。癌细胞的迅速增殖需要大量能量,L-酪氨酸作为重要的营养必需氨基酸,会影响人和动物的生长发育和新陈代谢^[20]。模型组中L-酪氨酸的含量较正常组降低可能与CAC模型中癌细胞的繁殖有关。瓜氨酸是一种非蛋白质氨基酸,具有形成肽键能力,但不能合成蛋白质,常作为胃肠道损伤的诊断指标,研究表明胃肠道损伤患者、克罗恩病患者的瓜氨酸含量均降低^[21-22],与本实验结果一致。甘氨酸是化学结构最简单的天然氨基酸,主要通过丝氨酸途径合成,

大部分甘氨酸用于蛋白质合成,此外还与炎症反应有关^[23],有学者发现甘氨酸可减少TNF- α 和IL-1 β 释放,加速抗炎因子IL-10释放,改善大肠炎模型中的上皮细胞刺激和损伤^[24]。瓜氨酸与甘氨酸都具有抗氧化与增强免疫力作用,模型组中甘氨酸、瓜氨酸的含量较正常组均降低,可能与肠道损伤、炎症、免疫力下降及氧化应激增强有关。

4.4 糖代谢 涉及糖代谢的潜在生物标志物为肌肉肌醇。肌肉肌醇与葡萄糖转运体活化和葡萄糖利用有关,可增强胰岛素降糖效应,降低血糖效应^[25]。相关学者发现在各种类型肿瘤中肌肉肌醇的变化一致,均为下降趋势^[26],本研究中模型组的变化趋势与其一致,HDW作用后肌肉肌醇仍显著降低,可能与HDW发挥治疗作用需消耗一定量的葡萄糖有关。

综上所述,HDW对CAC具有治疗作用,其作用机制可能是通过干预血清代谢物肌肉肌醇和烟酰胺含量,调节烟酸盐和烟酰胺代谢通路、肌醇磷酸盐代谢通路,干预能量代谢和糖代谢,进而影响炎症因子表达,抑制炎症,与目前CAC发病机制与炎症反应有关的结论相一致。本实验运用了UPLC-Q-TOF-MS技术的血清代谢组学方法,但UPLC-Q-TOF-MS技术分辨率较低,较难检测到极性小的代谢物,且人体除血液外还有尿液、粪便等多种代谢产物。因此,仅通过UPLC-Q-TOF-MS技术筛选血清的差异代谢物对于HDW治疗CAC作用机制研究而言不够全面。后续将在此基础上通过气相色谱质谱联用技术、核磁共振氢谱技术对小鼠血清、尿液、粪便等代谢物进行研究,为HDW治疗CAC的作用机制阐释进行系统完善。

[参考文献]

[1] 郝亮亮,何涛宏,谭炜焯,等. 中医药干预结肠炎-癌转化的研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2019,40(12):69-72.

[2] 邓颂,王爱萍,陈曦,等. 黄芪白术汤下调miR-31-5p/STAT3环路抑制结肠炎相关性结肠癌进程[J]. 中国药理学通报,2019,35(9):1308-1313.

[3] TERZIĆ J, GRIVENNIKOV S, KARIN E, et al. Inflammation and colon cancer[J]. Gastroenterology, 2010,138(6):2101-2114.

[4] 李伟伟. MiRNAs在结肠炎相关结肠癌发生过程中的作用机制研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.

[5] 刘婷婷. PLK1在结肠炎相关结肠癌发生中的作用[D]. 北京:北京协和医学院,2017.

[6] PUCHADES-CARRASCO L, PINEDA-LUCENA A. Metabolomics in pharmaceutical research and development [J]. Curr Opin Biotechnol, 2015, 35: 73-77.

[7] WANG X J, SUN H, ZHANG A H, et al. Potential role of metabolomics approaches in the area of traditional Chinese medicine: as pillars of the bridge between Chinese and western medicine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(5): 859-868.

[8] 喻凤. 痛泻要方调控TGF- β /SMAD4信号通路干预结肠炎相关性结肠癌的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学,2019.

[9] 迟宏罡,张淑华,于丰彦,等. 黄芩汤对结肠炎相关结肠癌Notch/Wnt信号通路的影响[J]. 广东医科大学学报,2018,36(4):375-380.

[10] 王骁,范焕芳,李德辉,等. 白花蛇舌草的抗癌作用研究进展[J]. 中国药房,2019,30(10):1428-1431.

[11] KOHNO H, SUZUKI R, SUGIE S, et al. β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate [J]. Cancer Sci, 2005, 96(2): 69-76.

[12] 张瑞,朱娜,马静,等. 一种溃疡性结肠炎相关性结肠癌小鼠模型的建立[J]. 山西医科大学学报,2016,47(8):720-723.

[13] 张磊,范志娟,康华,等. HPLC/MS分析乙肝相关性肝细胞癌的血清代谢轮廓分析[J]. 南方医科大学学报,2019,39(1):49-56.

[14] 西旺,闫起,王燕,等. 基于中医方证代谢组学分析四物汤对自然衰老小鼠的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(12):9-14.

[15] 迪丽索耶尔·亚勒坤木,付佳琪,于栋华,等. 灵芝多糖对辐射损伤小鼠影响的胸腺代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(3):102-109.

[16] 杨驰,郑咏秋,戴敏. 烟酰胺药理作用研究进展[J]. 临床肺科杂志,2011,16(12):1914-1916.

[17] TRAISTER A, BREITMAN I, BAR-LEV E, et al. Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells[J]. Scand J Gastroenterol, 2005, 40(10):1226-1234.

[18] 张静姝,陈炳卿,高彦辉,等. 共轭亚油酸对肿瘤细胞亚油酸代谢途径中限速酶的影响[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(3):195-198.

[19] 刘海叶. 基于代谢组学的养阴益肺方治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气阴两虚证作用机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2017.

[20] JUKARAINEN S, HEINONEN S, RÄMÖ J T, et al.

- Obesity is associated with low NAD⁺/SIRT pathway expression in adipose tissue of BMI-discordant monozygotic twins[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(1):275-283.
- [21] BLIJLEVENS N M A, LUTGENS L C H, SCHATTENBERG A V M, et al. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 34(3):193-196.
- [22] CRENN P, NEVEUX N, CHEVRET S, et al. Plasma L-citrulline concentrations and its relationship with inflammation at the onset of septic shock: a pilot study [J]. *J Crit Care*, 2014, doi: 10.1016/j.jcrc.2013.11.015.
- [23] 范小庆, 扈金萍. 甘氨酸生理功能与代谢研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2018, 45(2):102-107.
- [24] TSUNE I, IKEJIMA K, HIROSE M, et al. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(3):775-785.
- [25] 尹雪萍. 肌肉肌醇对糖尿病大鼠糖代谢和胃肠动力的影响研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
- [26] 方萌. 甲状腺乳头状癌血清代谢组学研究及临床意义[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
- [责任编辑 刘德文]

·书讯·

探讨综合护理干预预防下肢骨折手术术后并发深静脉血栓的价值 ——评《骨折分类图表手册》

深静脉血栓(DVT)是临床中的常见病及多发病,导致DVT发生的原因多为在深静脉中血液出现异常凝滞使得静脉回流发生障碍,主要在下肢中多发。假如血栓发生脱落时,会使患者继发肺动脉栓塞(PE),患者的生活质量水平显著降低,甚至会出现死亡。导致DVT形成属于多种因素相互影响的结果。常见影响DVT发生的相关影响因素包括:肿瘤、肥胖、性别、年龄、肢体固定、麻醉、手术时间、手术操作等局部或全身疾病。DVT形成后的远期并发症及相关临床综合征都会严重影响患者的正常生活及工作。因为骨折手术患者存在相关风险影响因素,如高凝的血液状态、血管损伤、长期制动、长期卧床等,使得骨折患者在术后容易得并发症DVT,同时也是导致患者院内非预期死亡风险增加及住院时间延长的一项重要原因。因此,怎样在骨折患者术后有效的预防DVT形成,是临床医护人员的一项关注重点及热点。为了确保骨折患者成功治疗,降低患者术后发生DVT的比率,医护人员一定要给予骨折患者术后实施有效的护理干预工作,本文将结合《骨折分类图表手册》一书探讨综合护理干预预防下肢骨折手术术后并发深静脉血栓的价值。

《骨折分类图表手册》由张世民等编著。书中收集了临床常用的分类方法,吸纳了近10年来的最新骨折分类进展。针对各个不同生理解剖位置的分类内容及方法进行分析及整理,有利于从事骨折治疗及护理人员进行骨折方面的学习,便于其在日后工作中更加规范、专业的进行骨折治疗及护理。

下肢骨折患者术后综合护理干预主要包括以下几方面的内容:第一,踝泵运动。通过运动踝关节,使肌肉的舒张及收缩得以被带动,发挥类似于泵的效果,使下肢淋巴回流及血液循环。踝泵运动可以有效预防形成DVT,缓解患者在术后发生肿胀的现象。且踝泵运动拥有较小的活动量,仅仅脚踝移动,无需腿部及身体移动,因此安全性较高。除了合并踝关节手术的患者不能使用踝泵运动进行练习,其他术后卧床骨折患者,能够在消退麻醉后进行踝泵运动的练习。患者在床上呈坐位或者仰卧位,放松大腿,然后用力、缓慢的、在仅出现轻微疼痛或者没有疼痛的限度当中,最大角度的进行向上勾脚,然后往下踩,注意在最大位置时持续至少3s,持续收缩肌肉。在确认患者的病情许可时,1次/h,3min/次,10~15次/d。第二,医用弹力袜。医用弹力袜的设计原理为按循序减压,可以有效促进患者的血液循环,使患者下肢肌肉力量显著增强,从而降低患者发生DVT的风险及比率。其作用机制主要包括:(1)降低患者下肢静脉扩张程度,保护患者的下肢血管内膜免受损伤,预防发生DVT。(2)患者下肢血流速度显著提高,从而使得血液瘀滞情况得到有效改善。(3)患者下肢静脉瓣膜作用显著增强,从而使得血液瘀滞情况得到改善。(4)阻止机体释放相关下肢组织因子。此外,患者穿着医用弹力袜,能够给患者的下肢施加一定压力,从而减小下肢的横截面积,使静脉血液的回流速度显著提高,降低DVT的发生比率。在下肢骨折术后给予患者穿着高压长筒弹力袜(U级),能够在患者的脚踝位置建立最高的支撑压力,且这一压力会顺着患者的腿部不断往上递减。在患者的小腿肚位置,压力会减小至最大压力约70%~90%;在患者的大腿位置,压力处会减小至最大压力值的约25%~45%。不断递减的压力变化会促使患者下肢静脉的血液回流,改善或缓解静脉瓣膜或者下肢静脉所受的压力。第三,间歇气体压迫装置(IPC)。2次/d,30min/次。这一装置在使用时会形成较强的一种静脉血流搏动,可以使得静脉被间断性地排空,既能够将静脉窦及主流静脉当中发生滞留的血液清除干净,同时还能够将静脉瓣后残存在无效位置的血流清除干净。其通过多腔充气加压,让患者下肢能够全部呈现梯度加压,大腿所受压力小于小腿,使得患者下肢的血液循环得到有效促进,预防聚集凝血因子并黏附血管内膜,血液流速得以增加,降低发生DVT的风险及比率。同时,IPC还可以短暂性的改变机体的纤溶系统及血流动力学,增加机体的纤溶活性,但不会增加发生出血的风险,特别适用于骨折患者手术术后使用。

(作者褚思思,郭晓彤,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)