

基于代谢组学的经典名方槐花散治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究

韩丽颖¹, 于浩¹, 李天娇^{1,2}, 王帅^{1,2}, 包永睿^{1,2}, 孟宪生^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连116600; 2. 辽宁省中药多维分析专业创新技术中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连116600)

[摘要] 该研究基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS) 技术研究槐花散对溃疡性结肠炎小鼠的干预及血清代谢物的影响, 探究槐花散治疗溃疡性结肠炎的作用机制。采用致炎剂葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 建立溃疡性结肠炎小鼠模型, 通过检测疾病活动指数 (disease activity index, DAI), 结肠外观评价, 结肠组织形态和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 等炎症因子的含量, 初步评价槐花散对溃疡性结肠炎小鼠的治疗效果。利用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术检测空白组、模型组以及槐花散低、中、高剂量组小鼠血清样本内源性代谢轮廓谱, 以主成分分析 (principal components analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 及正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等多元统计分析进行模式识别, 以 Mass Profiler Professional (MPP) B. 14. 00 软件中 fold change ≥ 2 且 $P < 0.05$ 为条件筛选潜在生物标志物, 并借助 MetaboAnalyst 5.0 数据库富集代谢通路。结果表明, 槐花散可以显著改善溃疡性结肠炎小鼠一般状态, 降低 DAI 评分, 改善结肠组织形态, 并降低小鼠血清中 TNF- α , IL-6 和 IL- 1β 的含量。代谢组学结果显示, 与槐花散调控相关的潜在生物标志物共 38 个, 主要涉及甘油磷脂代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 葡萄糖醛酸的相互转化和谷胱甘肽代谢等代谢通路。该研究利用代谢组学分析槐花散治疗溃疡性结肠炎的作用机制, 为进一步深入研究奠定基础。

[关键词] 槐花散; 溃疡性结肠炎; 潜在生物标志物; 代谢通路

Mechanism of famous classical formula Huaihua Powder in treatment of ulcerative colitis based on metabonomics

HAN Li-ying¹, YU Hao¹, LI Tian-jiao^{1,2}, WANG Shuai^{1,2}, BAO Yong-rui^{1,2}, MENG Xian-sheng^{1,2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
2. Liaoning Professional Innovation Technology Center for Multidimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

[Abstract] Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS) was employed in this study to observe the effect of Huaihua Powder on the serum metabolites of mice with ulcerative colitis and reveal the mechanism of Huaihua Powder in the treatment of ulcerative colitis. The mouse model of ulcerative colitis was established by dextran sodium sulfate salt (DSS). The therapeutic effect of Huaihua Powder on ulcerative colitis was preliminarily evaluated based on the disease activity index (DAI), colon appearance, colon tissue morphology, and the content of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin- 1β (IL- 1β). UHPLC-Q-TOF-MS was employed to profile the

[收稿日期] 2022-09-01

[基金项目] 辽宁省重点研发计划项目 (2020JH2/10300088)

[通信作者] * 孟宪生, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效物质组学及作用机制整合研究, E-mail: mxsvvv@126.com

[作者简介] 韩丽颖, 硕士研究生, E-mail: 13130802782@163.com

endogenous metabolites of serum samples in blank control group, model group, and low-, medium-, and high-dose Huaihua Powder groups. Multivariate analyses such as principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed for pattern recognition. Potential biomarkers were screened by Mass Profiler Professional (MPP) B. 14.00 with the thresholds of fold change ≥ 2 and $P < 0.05$. The metabolic pathways were enriched by MetaboAnalyst 5.0. The results showed that Huaihua Powder significantly improved the general state and colon tissue morphology of mice with ulcerative colitis, reduced DAI, and lowered the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum. A total of 38 potential biomarkers were predicted to be related to the regulatory effect of Huaihua Powder, which were mainly involved in glycerophospholipid metabolism, glycine, serine, and threonine metabolism, mutual transformation of glucuronic acid, and glutathione metabolism. This study employed metabolomics to analyze the mechanism of Huaihua Powder in the treatment of ulcerative colitis, laying a foundation for the further research.

[Key words] Huaihua Powder; ulcerative colitis; potential biomarker; metabolic pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20221025.401

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis) 是发生在结肠、直肠以及黏膜下层的非特异性炎症性肠病, 病症特点为起病缓、反复发作, 临床以腹痛、腹泻为主, 里急后重、黏液便与便秘等交替出现, 该病有终身复发倾向, 病程严重者会延续无法治愈, 是世界上消化系统疑难病之一^[1-3]。根据记载与溃疡性结肠炎相关的中医病名最早为“肠澼”, 后又出现“下利”“滞下”“休息痢”“痢疾”等^[4]。目前临床上治疗溃疡性结肠炎多以抗生素、免疫制剂、固醇类等为主^[5], 其作用只起到缓解溃疡性结肠炎病症, 长期服用还会出现肾脏毒性^[6]。而中医药在溃疡性结肠炎治疗中因其辨病辨证体系和安全有效的特点备受关注^[7-9]。

槐花散为中医经典名方百首之一^[10], 出自南宋·许叔微的《普济本事方》^[11], 方中由槐花(炒)清肠止血为君药, 侧柏叶(焙)凉血止血、荆芥穗理血疏风为臣药, 枳壳(去穰, 麸炒)行气以宣通大肠为佐使药, 具有疏风利气、清肠凉血的功效。槐花散中含有芦丁、多糖和鞣皮素等成分, 具有有效的抗炎作用^[12-13], 但其治疗溃疡性结肠炎作用机制的研究尚未明确清晰。故本研究在探讨槐花散对溃疡性结肠炎的干预作用下, 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS) 技术的代谢组学方法^[14-16]考察溃疡性结肠炎小鼠血清代谢物及代谢通路的变化, 分析槐花散对溃疡性结肠炎小鼠血清代谢物及代谢通路的影响, 探讨槐花散对溃疡性结肠炎的作用机制, 为槐花散治疗溃疡性结肠炎的深入研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性健康 Balb/c 小鼠, 体质量 (20 \pm 2) g, 购于辽宁长生生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物饲养于温度 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 55% \pm 5%、自然昼夜节律光照环境下, 自由饮水进食。

1.2 药物与试剂 葡聚糖硫酸钠盐 (dextran sulfate sodium salt, DSS) (Meilunbio 公司, 批号 M0510B); 固肠止泻丸 (西安阿房宫药业有限公司, 批号 201750); 美沙拉嗪肠溶片 (葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司, 批号 210112); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫吸附试剂盒 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) (上海科兴生物科技有限公司, 批号分别为 21071230N、21071233N、20171235N); 组织固定液 (Meilunbio 公司, 批号 MA0192); 甲醇 (色谱级, Merck 公司); 乙腈 (色谱级, Merck 公司)。

1.3 仪器 6550 Q-TOF-MS 质谱仪 (安捷伦科技有限公司); 1290 超高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); 22331 Hamburg 高速低温离心机 (Eppendorf 公司); SpectraMax Plus384 酶标仪 (Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 槐花散的制备 取槐花散经方组成中炒槐花、侧柏叶、荆芥穗、麸炒枳壳 4 味药材及饮片, 粉碎机粉碎后, 过 5 号筛, 等量称取各药材粉末, 混合均匀, 备用。

2.2 动物分组、给药及取材 将小鼠随机分为空白

组、模型组、槐花散给药组(低剂量 $1.04 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 约为人临床等效剂量; 中剂量 $1.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 为人临床等效剂量 1.5 倍; 高剂量 $3.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 为人临床等效剂量 3 倍)、中药阳性药固肠止泻组 ($0.624 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 为人临床等效剂量)、西药阳性药美沙拉嗪组 ($0.078 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 为人临床等效剂量), 每组 8 只。除空白组外, 小鼠均给予 2.5% DSS 水溶液连续饮用 7 d, 之后给予三级水连续饮用 10 d, 17 d 为一个周期, 重复上述周期 3 次^[17-18]。第一周期结束后小鼠开始灌胃给药, 空白组及模型组小鼠灌胃等量蒸馏水, 灌胃剂量均为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$, 至 3 个周期结束及末次给药结束后, 摘眼球取血, 常温静置 30 min, $2\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将血清分装并保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 截取近肛门段 2 cm 的结肠组织, 浸入 4% 多聚甲醛中, 备用。

2.3 小鼠一般状态和疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分 实验期间每天观察小鼠一般情况, 包括体质量、毛色、活动、粪便等情况, 并分别赋分, 计算小鼠 DAI。粪便潜血实验: 把粪便碾碎放在白纸上, 先滴加两滴邻联甲苯胺, 再滴加两滴过氧化氢。如果有隐血, 会显蓝色, 隐血量比较大显蓝褐色。DAI = 体质量下降率 + 粪便潜血 + 粪便黏稠度^[19]。DAI 评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

Table 1 Scoring criteria of DAI

评分	体质量下降率/%	粪便潜血	粪便黏稠度
0	0	阴性	正常粪球
1	1~5	阳性(+)	粪便成形, 但易粘附
2	5~10	阳性(2+)	粪便半成形/稀软
3	10~20	阳性(3+)	粪便呈稀浆状, 但不粘附于肛门
4	>20	阳性(4+)	腹泻, 粘附于肛门

注: 阳性(+) 显浅黄绿色; 阳性(2+) 显蓝绿色; 阳性(3+) 显深蓝绿色; 阳性(4+) 为肉眼可见明显黏脓血便。

2.4 小鼠结肠长度、结肠质量指数及肠黏膜损伤指数 (colon macroscopic damage index, CMDI) 剪取全结肠放于面板, 测量长度, 用 0.9% 氯化钠溶液冲洗结肠后滤纸吸干水分, 称量结肠湿重, 计算结肠质量指数。结肠质量指数 = 每只小鼠结肠质量(g) / 每只小鼠体质量(g) × 100%。结肠黏膜损伤评分标准见表 2。

表 2 CMDI 评分标准

Table 2 Scoring criteria of CMDI

评分	结肠特征
0	无损伤
1	黏膜充血, 水肿, 未出现溃疡
2	黏膜充血, 水肿, 轻度糜烂, 有单个溃疡
3	黏膜充血, 水肿, 高度糜烂, 有多个溃疡
4	黏膜充血, 水肿, 重度糜烂, 有 >1 cm 的溃疡

2.5 小鼠结肠组织 HE 染色 小鼠结肠组织样本于 4% 多聚甲醛固定, 固定状态良好后, 进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片, 最后镜检合格的样片。

2.6 小鼠血清生化指标的影响 取 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。

2.7 血清样本的制备 取 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的血清样本, 置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻。取 $100 \mu\text{L}$ 血清样本于 2 mL 离心管中, 加入 $300 \mu\text{L}$ 含 0.1% 甲酸的甲醇, 涡旋 60 s, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 转移至 2 mL 离心管中, 室温下真空浓缩干燥至干。残渣加入 $50 \mu\text{L}$ 的 70% 甲醇复溶, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 待测。取上述各小鼠血清样本 $10 \mu\text{L}$ 混合得到质量控制 (quality control, QC) 样本, 按上述方法备样。在样品分析前, 连续检测 8 个 QC 样本, 在样品分析过程中, 每进 8 针样品进 1 针 QC 样品, 以检验系统的稳定性与重复性。

2.8 UHPLC-Q-TOF-MS 条件 利用 UHPLC-Q-TOF-MS 正离子模式采集血清样本, 色谱柱为 Agilent poroshell SB-C₁₈ 120 色谱柱 ($2.1 \text{ mm}\times 100 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$), 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 ($0\sim 6 \text{ min}, 5\%\sim 65\% \text{ B}; 6\sim 13 \text{ min}, 65\%\sim 80\% \text{ B}; 13\sim 27 \text{ min}, 80\%\sim 92\% \text{ B}; 27\sim 30 \text{ min}, 92\%\sim 100\% \text{ B}$)。柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $3 \mu\text{L}$ 。

电喷雾离子源, 采用正离子模式, 毛细管电压 $4\ 000 \text{ V}$, 干燥气体流速 $13 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 干燥气体温度 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 雾化器压力 45 psi ($1 \text{ psi}\approx 6.895 \text{ kPa}$), 鞘气温度 $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速 $11 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 碎裂电压 125 V , 质量范围 $m/z 100\sim 1\ 000$ 。

2.9 药效学实验统计学处理 统计分析采用 SPSS 23.0 软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。t 检验分析用于检测 2 组数据间差异的统计学意

义,单因素方差分析用于检测 3 组或以上数据间差异的统计学意义, $P<0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2.10 代谢组学数据处理、分析及统计学处理 采用 Agilent MassHunter Profinder (B. 08. 00 版) 软件对 UHPLC-Q-TOF-MS 血清代谢质谱原始数据进行峰提取、峰对齐、峰匹配和峰强度校正等操作,百分比漂移为 75. 0, 转化为. cef 格式文件。进而将. cef 数据导入 Mass Profiler Professional (MPP) B. 14. 00 软件, 百分比漂移为 75. 0, 进行数据归一化处理, 得到的数据矩阵导入 SIMCA 14. 1 软件中, 进行无监督主成分分析 (principal components analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等多维统计分析; 并导出 MPP

软件中根据 $\text{fold change} \geq 2$ 且 $P<0.05$ 筛选的差异性代谢物, 根据其保留时间、精准相对分子质量和目标 MS/MS 结果, 利用 METLIN 数据库进行质谱信息匹配, 同时参照有关文献对化合物进行结构鉴定, 最终对已鉴定结构的代谢标志物通过 MetaboAnalyst 5. 0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行代谢通路分析。

3 结果

3.1 小鼠一般状态和 DAI 评分 模型组小鼠腹泻, 多有便血, 弓背明显, 蜷缩扎堆, 被毛逆立, 精神萎靡。空白组、给药组小鼠均较为活泼, 毛发光滑, 精神状态良好。与空白组相比, 模型组小鼠 DAI 评分显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 各给药组小鼠 DAI 评分显著降低 ($P<0.05$), 趋于空白组; 综合结果分析显示, 各给药组小鼠止泻、止血及改善体质量作用均较明显, 见表 3。

表 3 槐花散对溃疡性结肠炎小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

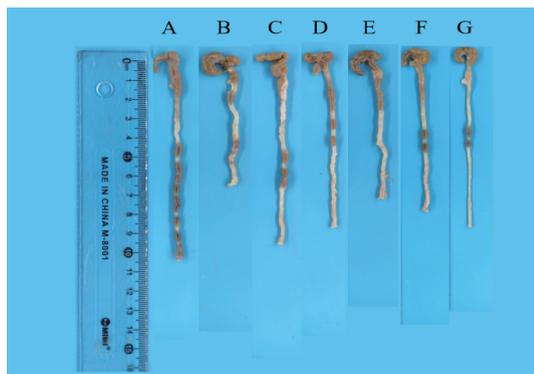
Table 3 Effect of Huaihua Powder on mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量下降率评分/分	粪便黏稠度评分/分	粪便潜血评分/分	DAI 评分/分
空白	-	0	0	0.37±0.52	0.13±0.34
模型	-	2.31±0.48 ²⁾	1.80±0.42 ²⁾	3.27±0.48 ²⁾	7.43±0.70 ²⁾
美沙拉嗪	0.078	1.14±0.35 ⁴⁾	0.56±0.20 ⁴⁾	2.10±0.57 ⁴⁾	3.67±1.25 ⁴⁾
固肠止泻	0.624	0.80±0.19 ⁴⁾	1.33±0.21 ³⁾	2.56±0.70 ³⁾	4.88±1.44 ⁴⁾
槐花散	1.04	1.59±0.48 ³⁾	1.22±0.63 ³⁾	2.43±0.67 ³⁾	5.63±1.57 ³⁾
	1.56	1.48±0.36 ³⁾	1.01±0.47 ⁴⁾	1.69±0.95 ⁴⁾	4.46±1.65 ⁴⁾
	3.12	1.25±0.29 ⁴⁾	1.18±0.42 ³⁾	1.42±0.63 ⁴⁾	3.85±1.48 ⁴⁾

注: 空白组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 4~6 同)。

3.2 小鼠结肠长度、结肠质量指数及 CMDI 评分 与空白组相比, 模型组小鼠结肠长度减短, 结肠质量指数明显升高 ($P<0.01$), 说明模型组小鼠结肠炎症反应明显; 与模型组相比, 各给药组小鼠结肠长度明显增加, 结肠质量指数明显降低 ($P<0.05$), 接近空白组, 说明各给药组均能缓解结肠炎症反应, 且各给药组间具有一定的差异, 见图 1、表 4。

3.3 小鼠结肠组织病理学 HE 染色 在显微镜 (200 倍) 视野下, 空白组小鼠黏膜层可见少量上皮细胞脱落, 固有层肠腺数量丰富, 未见明显炎症; 与空白组相比, 模型组小鼠黏膜层可见重度糜烂, 多见肠腺数量减少, 结缔组织增生 (黑色箭头), 伴有大量淋巴细胞与中性粒细胞浸润 (黄色箭头), 大量溃疡形成, 可见上皮细胞脱落 (红色箭头); 各给药组较模型组结肠组织结构基本完整, 局部可见轻度糜



A. 空白组; B. 模型组; C. 美沙拉嗪组; D. 固肠止泻组; E. 槐花散低剂量组; F. 槐花散中剂量组; G. 槐花散高剂量组 (图 2 同)。

图 1 各组小鼠结肠长度

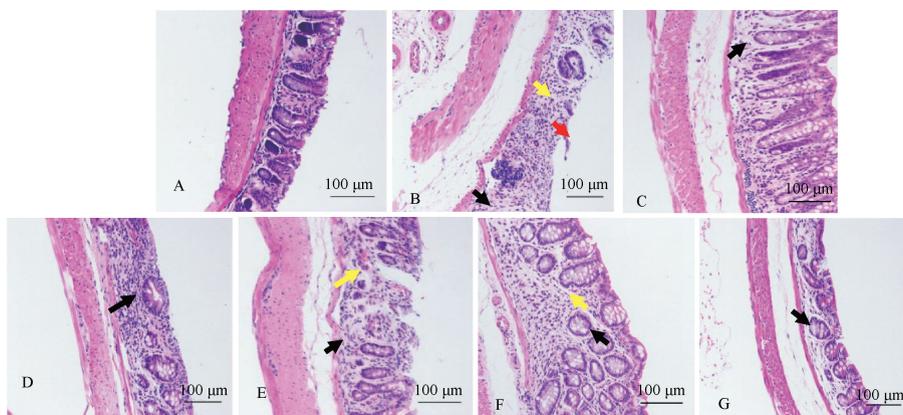
Fig. 1 Colon length of mice in each group

烂, 肠腺排列整齐, 固有层淋巴细胞浸润减少, 结肠

表4 各组小鼠结肠长度、结肠质量指数及CMDI评分($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 4 Colon length, colon weight index and CMDI score of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	结肠长度/cm	结肠质量指数	CMDI
空白	-	10.68 \pm 0.64	0.89 \pm 0.12	0.33 \pm 0.58
模型	-	6.60 \pm 0.36 ²⁾	1.35 \pm 0.20 ²⁾	1.97 \pm 0.31 ²⁾
美沙拉嗪	0.078	9.92 \pm 0.53 ⁴⁾	0.93 \pm 0.14 ³⁾	0.87 \pm 0.24 ⁴⁾
固肠止泻	0.624	9.14 \pm 0.44 ³⁾	0.96 \pm 0.13 ³⁾	0.94 \pm 0.40 ⁴⁾
槐花散	1.04	7.97 \pm 0.31 ³⁾	1.23 \pm 0.11 ³⁾	1.54 \pm 0.66 ³⁾
	1.56	8.65 \pm 0.61 ³⁾	1.13 \pm 0.16 ³⁾	1.33 \pm 0.36 ³⁾
	3.12	9.86 \pm 0.48 ⁴⁾	0.98 \pm 0.09 ³⁾	0.90 \pm 0.33 ⁴⁾

的病理特征减弱,槐花散高剂量组和美沙拉嗪组病理结构与空白组接近,说明治疗效果较好,见图2。

图2 各组小鼠结肠组织病变情况(HE染色, $\times 200$)Fig. 2 Pathological changes of colon tissue in mice of each group(HE staining, $\times 200$)

3.4 小鼠血清炎性因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平
与空白组相比,模型组小鼠血清炎性因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量明显升高($P < 0.01$);与模型组比

较,阳性药组、槐花散给药组小鼠血清炎性因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量明显降低($P < 0.05$),表明槐花散可抑制结肠炎小鼠的炎症反应,见表5。

表5 各组小鼠炎性因子的比较($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 5 Comparison of inflammatory factors in mice of each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

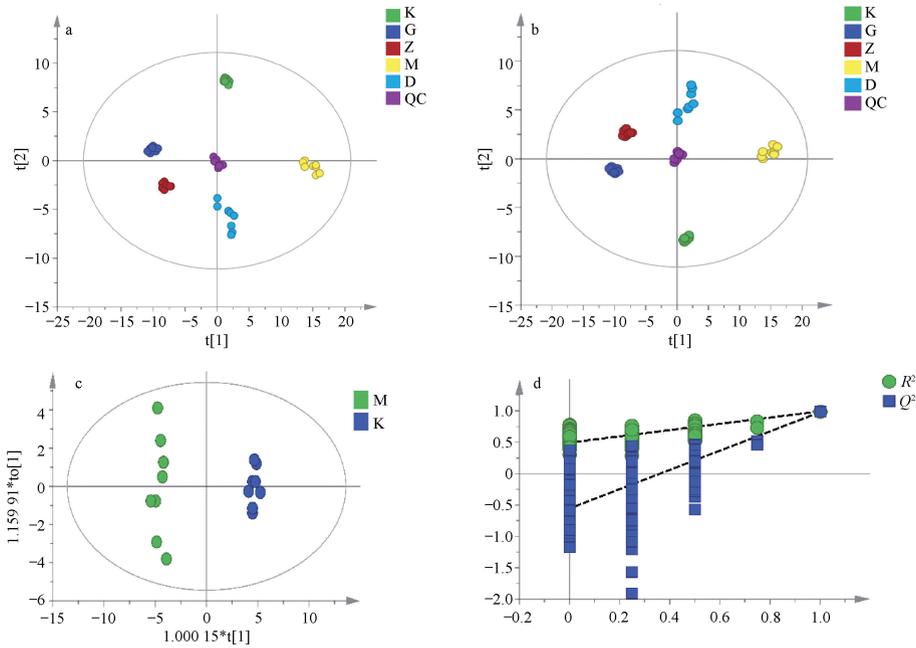
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-1 β / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白	-	83.61 \pm 3.93	90.68 \pm 4.63	56.72 \pm 3.80
模型	-	121.22 \pm 5.20 ²⁾	116.52 \pm 4.21 ²⁾	102.20 \pm 4.47 ²⁾
美沙拉嗪	0.078	97.59 \pm 3.86 ⁴⁾	94.43 \pm 4.76 ⁴⁾	71.93 \pm 6.26 ⁴⁾
固肠止泻	0.624	97.65 \pm 5.76 ⁴⁾	92.13 \pm 3.93 ⁴⁾	76.13 \pm 4.92 ⁴⁾
槐花散	1.04	115.30 \pm 2.45 ³⁾	109.52 \pm 5.67 ³⁾	88.71 \pm 4.56 ⁴⁾
	1.56	100.12 \pm 4.63 ⁴⁾	101.36 \pm 5.10 ⁴⁾	82.52 \pm 3.90 ⁴⁾
	3.12	98.32 \pm 3.19 ⁴⁾	95.62 \pm 4.58 ⁴⁾	72.62 \pm 6.68 ⁴⁾

3.5 溃疡性结肠炎小鼠血清代谢产物的多元统计分析
将各组小鼠血清样本数据通过 SIMCA 14.1 软件进行 PCA。PCA 结果表明,各组样品及 QC 样本聚集良好,说明该检测系统稳定可靠,所得差异物能反映

样本间的生物学差异,见图 3a。PLS-DA 结果显示,各组间有所离散,说明各组小鼠代谢轮廓发生变化,槐花散高剂量组趋近于空白组,表明槐花散对溃疡性结肠炎小鼠有效,见图 3b。OPLS-DA 结果显示,空白

组与模型组分离明显,并对模型进行 200 次随机置换检验($R^2 = 0.993, Q^2 = 0.979$),结果显示 R^2 和 Q^2 均

大于 0.9,说明所建模型未出现过拟合现象,具有良好的预测能力和可靠性,见图 3c、3d。



K. 空白组;M. 模型组;D. 槐花散低剂量组;Z. 槐花散中剂量组;G. 槐花散高剂量组;QC. 质控样本。

图 3 各组大鼠血清代谢物 PCA(a)、PLS-DA(b)、OPLS-DA(c)以及置换检验(d)得分图

Fig. 3 PCA(a), PLS-DA(b), OPLS-DA(c) plots and permutation test (d) scores of serum metabolites in rats of each group

3.6 槐花散影响溃疡性结肠炎小鼠代谢的潜在生物标志物 通过 MPP 软件筛选潜在生物标志物 (fold change ≥ 2 且 $P < 0.05$),将筛选的潜在生物标志物通过 METLIN 数据库鉴定,结果显示,与空白组比较,模型组中有 49 个物质的含量发生了变化,其中 1-油酸溶血磷脂酸、L-gamma-谷氨酰-L-异亮氨酸、L-丙氨酸、精氨酸等 45 个物质含量显著下调,酪胺葡萄糖醛酸苷、山嵛酸酰胺、十四碳二元酸、溶血磷脂酰胆碱(16:0)这 4 个含量显著上调;与模型组比较,槐花散高剂量组中有 38 个物质含量发生了变化,其中不能回调 1-油酸溶血磷脂酸[18:1(9Z)/0:0]、L-gamma-谷氨酰-L-异亮氨酸、L-异白氨酰-L-脯氨酸、亚油酰肉碱、溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/16:0)、溶血磷脂酰乙醇胺[18:1(11Z)/0:0]等 11 个物质,见表 6。

3.7 代谢通路的分析 将以上潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 构建溃疡性结肠炎小鼠血清的代谢通路富集图,筛选 pathway impact >0 及 $-\lg P > 0.6$ 的 5 条与溃疡性结肠炎相关的代谢通路,分别为甘油磷脂代谢,谷胱甘肽代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨

酸代谢,脂肪代谢,戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化,槐花散能够显著回调甘油磷脂代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化,谷胱甘肽代谢这 4 条通路 (pathway impact >0 及 $-\lg P > 0.5$),并对精氨酸和脯氨酸代谢、色氨酸代谢这 2 条途径也有一定影响 (pathway impact >0 及 $-\lg P > 0.4$),见图 4。

4 讨论

本研究通过建立 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型,观察槐花散给药后小鼠体质量下降率、DAI 评分、结肠表观评价及其组织病理变化,基于 UHPLC-Q-TOF-MS 对小鼠血清样本进行代谢组学分析,通过 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 明确模型准确性及各组间代谢差异,并通过 MPP 软件筛选潜在生物标志物,鉴定潜在生物标志物。结果表明,槐花散可明显降低 DAI 评分,改善结肠表观状态,降低炎症因子含量。以上结果表明槐花散对溃疡性结肠炎具有一定治疗作用。小鼠血清样本代谢组学分析结果显示,溃疡性结肠炎小鼠血清样本中得到 49 个潜在生物标志物,主要包括溶血磷脂酰胆碱

表6 潜在生物标志物的信息

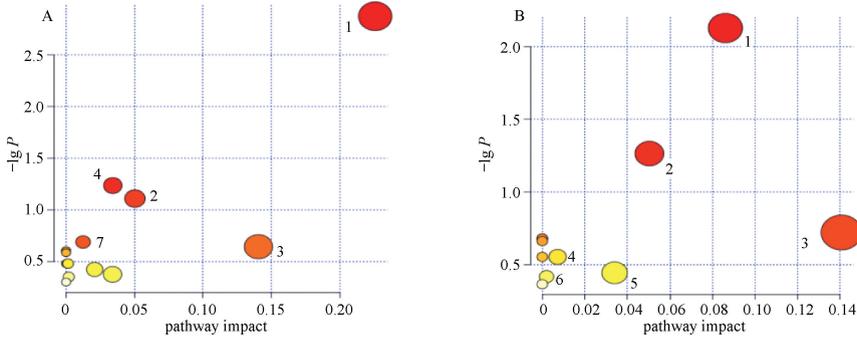
Table 6 Information of potential biomarkers

No.	潜在生物标志物		t_R /min	m/z	变化趋势	
	中文名	英文名			M vs N	H vs M
1	亚精胺	spermidine	0.501 0	145.157 5	↓ ²⁾	↑ ³⁾
2	1-油酸溶血磷脂酸[18:1(9Z)/0:0]	LysoPA[18:1(9Z)/0:0]	17.139 4	458.240 8	↓ ¹⁾	-
3	1,2-二酰甘油磷脂	1,2-diacyl-glycerophospholipid	29.601 1	614.393 2	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
4	17-表雌三醇	17-epiestriol	22.941 0	310.155 3	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
5	2,5-二甲氧基肉桂酸	2,5-dimethoxycinnamic acid	6.505 1	230.054 4	↓ ¹⁾	↑ ³⁾
6	3-巯基乳酸-半胱氨酸二硫化物	3-mercaptolactate-cysteine disulfide	1.293 1	258.034 3	↓ ²⁾	↑ ³⁾
7	3a,7b,12a-三羟基氧胆酰甘氨酸	3a,7b,12a-trihydroxyoxocholanyl-glycine	10.694 9	487.291 0	↓ ²⁾	↑ ³⁾
8	3-甲基吲哚	3-methylindole	1.656 3	131.072 8	↓ ²⁾	-
9	5'-甲硫腺苷	5'-methylthioadenosine	2.999 8	297.087 9	↓ ²⁾	-
10	D-苯基乳酸	D-phenyllactic acid	8.666 0	166.062 3	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
11	L-gamma-谷氨酰-L-异亮氨酸	L-gamma-glutamyl-L-isoleucine	3.351 1	260.136 0	↓ ²⁾	-
12	L-alpha-天冬氨酰-L-羟脯氨酸	L-alpha-aspartyl-L-hydroxyproline	6.940 0	246.085 6	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
13	L-alpha-谷氨酰-L-羟脯氨酸	L-alpha-glutamyl-L-hydroxyproline	7.553 0	260.101 6	↓ ¹⁾	-
14	L-苏氨酸	L-threonine	4.205 9	234.085 6	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
15	L-丙氨酸	L-alanine	0.634 0	89.047 6	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
16	L-异白氨酰-L-脯氨酸	L-isoleucyl-L-proline	0.894 3	228.146 3	↓ ²⁾	-
17	N1,N12-二乙酰精胺	N1,N12-diacetylspermine	18.963 1	308.218 3	↓ ²⁾	↑ ³⁾
18	N-乙酰-7-O-乙酰神经氨酸	N-acetyl-7-O-acetylneuraminic acid	3.769 0	184.071 3	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
19	苯甲醛	benzaldehyde	12.913 2	106.041 8	↓ ²⁾	↑ ⁴⁾
20	苯乙胺葡萄糖醛酸苷	phenethylamine glucuronide	10.179 0	314.148 6	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
21	胆碱	choline	0.871 7	103.099 5	↓ ²⁾	↑ ³⁾
22	石胆酸甘氨酸偶联物	lithocholic acid glycine conjugate	28.913 5	450.347 7	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
23	甘油磷脂酰乙醇胺	glycerylphosphorylethanolamine	3.843 4	237.036 8	↓ ¹⁾	↑ ³⁾
24	氧化谷胱甘肽	oxidized glutathione	1.257 6	612.149 0	↓ ¹⁾	-
25	葫芦巴碱	trigonelline	0.625 0	137.060 2	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
26	甘氨酸	glycine	4.731 6	173.104 3	↓ ¹⁾	↑ ³⁾
27	精氨酸	argininic acid	0.614 0	175.095 1	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
28	酪胺葡萄糖醛酸苷	tyramine glucuronide	7.448 5	330.142 6	↑ ²⁾	↓ ³⁾
29	邻氨基苯甲酸	anthranilic acid	0.637 4	137.047 1	↓ ²⁾	↑ ³⁾
30	前列腺素 F1a	prostaglandin F1a	7.504 9	378.235 6	↓ ¹⁾	↑ ³⁾
31	山嵛酸酰胺	docosanamide	28.942 4	339.347 1	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾
32	十四碳二元酸	tetradecanedioic acid	11.595 5	280.164 1	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾
33	甜菜碱	betaine	0.810 0	117.079 3	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
34	香草醛	vanillin	29.682 1	152.046 8	↓ ²⁾	↑ ³⁾
35	香豆素	coumarin	1.327 4	146.036 2	↓ ²⁾	↑ ³⁾
36	辛酰甘氨酸	capryloylglycine	6.688 0	201.135 9	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
37	亚油酰肉碱	linoleyl carnitine	12.510 1	423.333 3	↓ ¹⁾	-
38	愈伤酸	traumatic acid	6.019 9	250.117 0	↓ ¹⁾	↑ ³⁾
39	月桂酰肉碱	lauroylcarnitine	8.770 0	343.270 4	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
40	溶血磷脂酰胆碱(14:0)	LysoPC(14:0)	13.452 2	467.298 5	↓ ²⁾	↑ ³⁾
41	溶血磷脂酰胆碱(16:0)	LysoPC(16:0)	16.362 6	495.331 7	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾

续表6

No.	潜在生物标志物		t_R/min	m/z	变化趋势	
	中文名	英文名			M vs N	H vs M
42	溶血磷脂酰胆碱 [22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	LysoPC [22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	17.635 1	545.345 2	↓ ²⁾	↑ ⁴⁾
43	溶血磷脂酰胆碱 [20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)]	LysoPC [20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)]	18.181 0	521.349 1	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾
44	溶血磷脂酰胆碱(24:0)	LysoPC(24:0)	29.846 8	607.455 8	↓ ²⁾	↑ ³⁾
45	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/18:0)	LysoPE(0:0/18:0)	20.987 6	481.315 1	↓ ²⁾	↑ ³⁾
46	溶血磷脂酰乙醇胺 [20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0]	LysoPE [20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0]	15.621 1	501.283 5	↓ ²⁾	-
47	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/16:0)	LysoPE(0:0/16:0)	16.512 8	453.283 2	↓ ²⁾	-
48	溶血磷脂酰乙醇胺 [22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0]	LysoPE [22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0]	17.260 3	527.301 5	↓ ²⁾	↑ ³⁾
49	溶血磷脂酰乙醇胺 [18:1(11Z)/0:0]	LysoPE [18:1(11Z)/0:0]	18.262 7	479.298 9	↓ ²⁾	-

注:M.模型组;N.正常组;H.槐花散高剂量组;↓.下调;↑.上调;- .无变化。



A. 溃疡性结肠炎对小鼠代谢通路的影响;B. 槐花散对溃疡性结肠炎小鼠代谢通路的影响;1. 甘油磷脂代谢;2. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;3. 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化;4. 谷胱甘肽代谢;5. 精氨酸和脯氨酸代谢;6. 色氨酸代谢;7. 脂肪代谢。

图4 槐花散对溃疡性结肠炎小鼠代谢通路的影响

Fig. 4 Effect of Huaihua Powder on metabolic pathways in mice with ulcerative colitis

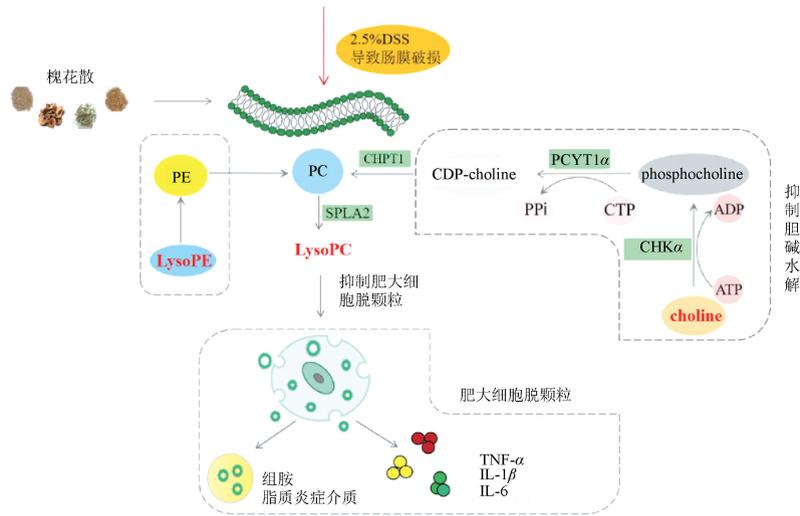
(lysophosphatidylcholine, LysoPC)、溶血磷脂酰乙醇胺 (lysophosphatidylethanolamines, LysoPE)、氨基酸和酰基肉碱等,涉及多条代谢过程。通过对比模型组和槐花散高剂量给药组的代谢物水平,发现槐花散给药后小鼠血清代谢物水平整体趋向于空白组,提示槐花散可能通过改善相关代谢过程,发挥其治疗溃疡性结肠炎的作用。

研究表明,甘油磷脂代谢异常通常发生在肠炎过程中^[20-21]。甘油磷脂是组成细胞膜的主要成分,磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PC) 是细胞膜中主要的甘油磷脂,在磷脂酶作用下 PC 水解产生 LysoPC^[22]。已有研究证明,饱和 LysoPC 加剧促炎性细胞因子的释放,加剧炎症产生^[23-24]。炎症反应的发生激活分泌型磷脂酶 A2 (phospholipase A2,

PLA2) 的增加,加速磷脂的水解^[25],从而增加机体内溶血磷脂及其他炎症介质的释放,诱导肥大细胞脱颗粒作用,增加 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症相关因子的产生,与炎症产生过程密切相关^[26-27]。胆碱 (choline, Cho) 在胆碱激酶 (choline kinase alpha, CHK α) 催化下产生磷酸胆碱 (phosphate choline, P-Cho), 然后 CTP: 磷酸胆碱胞苷酰转移酶 (phosphoryl cholinecytidyltransferase, PCYT1 α) 利用 P-Cho 与 CTP 释放焦磷酸盐 (pyrophosphate, PPi), 形成高供能 CDP-胆碱 (cytidine-diphosphocholine, CDP-Cho), 最后胆碱磷脂转移酶 1 (choline phosphotransferase, CHPT1) 与甘油二酯结合产生 PC,加剧了 PC 分解促进炎症产生^[28],见图 5。本实验发现,模型组小鼠血清中 Cho、PE、LysoPC 及

LysoPE 等生物标志物代谢异常,提示小鼠体内发生炎症反应的异常变化。而槐花散给药后其相对含量

趋向于空白组,说明槐花散可以抑制炎症反应,代谢通路显示可能与调节甘油磷脂代谢有关。



红色字体代表槐花散给药后与模型组相比含量上升的生物标志物。

图5 槐花散通过甘油磷脂代谢治疗小鼠溃疡性结肠炎的机制

Fig. 5 Effect of glycerophospholipid metabolism on the treatment of ulcerative colitis mice by Huaihua Powder

已有研究证明,溃疡性结肠炎与氨基酸代谢有关^[29]。甘氨酸是非必要氨基酸,大部分主要通过丝氨酸途径合成,能影响 NF- κ B 的活化,降低机体 TNF- α 和 IL-1 β 促炎因子水平,增加抗炎因子 IL-10 表达^[30-32],L-苏氨酸能够通过苏氨酸脱水酶、苏氨酸脱氢酶和苏氨酸醛缩酶催化转变为甘氨酸、丝氨酸等参与机体生理活动,能影响肠道炎症因子^[33]。本实验中,溃疡性结肠炎小鼠模型中甘氨酸和 L-苏氨酸下调明显,表明甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢紊乱。而槐花散给药后,小鼠体内甘氨酸和 L-苏氨酸明显回调,推测槐花散可能通过回调甘氨酸和 L-苏氨酸水平影响甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢,达到治疗溃疡性结肠炎小鼠的目的。

综上所述,槐花散对溃疡性结肠炎小鼠治疗作用明显,通过潜在生物标志物及代谢通路生物学意义分析,推测可能主要通过调节甘油磷脂代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路发挥作用,为临床上槐花散治疗溃疡性结肠炎提供进一步理论和实验基础。

【参考文献】

- [1] 管确. 中西医结合药物保留灌肠治疗慢性结肠炎 52 例[J]. 基层医学论坛, 2017, 21(26): 3578.
- [2] 孙豪娟, 孙贵香, 朱莹. 黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 219.
- [3] 曾思敏, 林武红, 罗鹏基, 等. 溃疡性结肠炎的中医药治疗

进展[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(6): 209.

- [4] 李格格, 白光, 焦政. 溃疡性结肠炎中医证型与肠镜象的相关性[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 90.
- [5] FIASSE R, DENIS M A, DEWIT O. Chronic inflammatory bowel disease: Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. J Pharm Belg, 2010, 65(1): 1.
- [6] 刘建荣. 中西医结合药物治疗慢性结肠炎 80 例[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(14): 138.
- [7] 陈双兰, 刘青松, 张怡, 等. 基于细胞信号通路探讨中药复方治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊 [2022-09-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20220722.1149.014.html>.
- [8] 赵仑. 清热利湿活血方口服配合中药灌肠对溃疡性结肠炎患者疗效及 ICAM-1、VCAM-1 影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(5): 96.
- [9] 孙娟, 蒋晓娟, 王亚东, 等. 基于高通量转录组测序探讨参苓白术散缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6155.
- [10] 国家中医药管理局. 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-16) [2022-09-01]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [11] 许叔微. 普济本事方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 52.
- [12] 郭呈金. 研究中药槐花的药理作用及炮制[J]. 智慧健康, 2018(1): 153.
- [13] 翟艳敏, 毛明强, 蒋楠, 等. 经典名方槐花散文献分析与考

- 证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 13.
- [14] 王洋洋, 冯卫生, 王秋红, 等. 基于“运脾生血”理论的熟地黄补血作用代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3562.
- [15] 华永丽, 马琪, 张晓松, 等. 基于尿液代谢组学和网络药理学整合策略研究白头翁汤治疗湿热泄泻的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3887.
- [16] 时正媛, 李京峰, 宝丽, 等. 金芪降糖片治疗 2 型糖尿病大鼠的血清代谢组学研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(8): 1081.
- [17] HWANG S, HWANG S, JO M, et al. Oral administration of Korean propolis extract ameliorates DSS-induced colitis in BALB/c mice[J]. Int J Med Sci, 2020, 17(13): 1984.
- [18] RODRIGUES V F, CAMELO G M A, DE REZENDE M C, et al. Infection by *Strongyloides venezuelensis* attenuates chronic colitis induced by dextran sodium sulfate ingestion in BALB/c mice[J]. Immunobiology, 2021, 226(5): 152129.
- [19] OH S Y, CHO K A, KANG J L, et al. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(2): 333.
- [20] MARTIN F P, REZZI S, PHILIPPE D, et al. Metabolic assessment of gradual development of moderate experimental colitis in IL-10 deficient mice[J]. J Proteome Res, 2009, 8(5): 2376.
- [21] 赵丽丽. NSAIDs 干预 RAW264.7 细胞炎症模型甘油磷脂代谢的 UPLC-Q/TOF MS 分析[D]. 广州: 广东药学院, 2012.
- [22] 贾冰洁. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术的炎症性肠病的血浆代谢组学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [23] STOCK C, SCHILLING T, SCHWAB A, et al. Lysophosphatidylcholine stimulates IL-1beta release from microglia via a P2X7 receptor-independent mechanism[J]. J Immunol, 2006, 177(12): 8560.
- [24] HUANG F, SUBBAIAH P V, HOLIAN O, et al. Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC α and PhoA cross talk[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(2): 176.
- [25] CHALIMONIUK M. Secretory phospholipase A2 and its role in oxidative stress and inflammation[J]. Postepy Biochem, 2012, 58(2): 204.
- [26] 杨银治, 夏时海. 磷脂酶 A2 在炎症反应中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(8): 795.
- [27] 陈旭刚, 屈树兰, 陈龙. 基于 LC-MS 研究肉桂醛对急性溃疡性结肠炎小鼠代谢组学的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 88.
- [28] 武彩红. 谷糠过氧化物酶通过重塑甘油磷脂代谢抑制结肠癌的效应机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [29] 施丽婕, 刘苏仪, 于潇, 等. 化癥通阳方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群和氨基酸代谢的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(19): 1731.
- [30] BLANCAS-FLORES G, ALARCÓN-AGUILAR F J, GARCÍA-MACEDO R, et al. Glycine suppresses TNF- α -induced activation of NF- κ B in differentiated 3T3-L1 adipocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 689(1/3): 270.
- [31] TSUNE I, IKEJIMA K, HIROSE M, et al. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat[J]. Gastroenterology, 2003, 125(3): 775.
- [32] 王淑, 王信, 孙萍, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 94.
- [33] 王亚玲, 王常安, 刘红柏, 等. 低鱼粉饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟抗氧化能力、消化生理及肠道炎症因子基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(4): 478.

[责任编辑 马超一]