

基于非靶向代谢组学探究消痔丸对巴豆油诱导的肛门肿胀类痔模型大鼠的作用机制

钱双喜¹, 韩彦琪^{2,3#}, 宫鹏飞¹, 李亚鹏¹, 李 新^{2,3}, 卢 朋^{2,3}, 许 浚^{2,3}, 赵专友^{2,3}, 柴国林^{1*}, 张铁军^{2,3*}

1. 兰州佛慈制药股份有限公司, 甘肃 兰州 730000

2. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津市中药质量标志物重点实验室, 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462

3. 和光中药科技(天津)有限公司, 天津 300462

摘要: **目的** 利用非靶向代谢组学方法探究消痔丸对巴豆油诱导的肛门肿胀类痔模型大鼠的作用机制。**方法** 建立巴豆油诱导的大鼠肛门肿胀类痔模型, 取对照组、模型组、消痔丸给药组血浆, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 法建立血浆代谢指纹谱, 筛选潜在生物标志物, 结合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)富集相关代谢通路并分析消痔丸对生物标志物的干预作用, 进而解析其作用机制。**结果** 共筛选鉴定出 35 个痔病潜在生物标志物, 涉及甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、自噬、三羧酸循环、精氨酸和脯氨酸代谢等 11 条代谢通路, 消痔丸干预后对其中 23 个生物标志物有显著调节作用。**结论** 消痔丸通过调控甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、自噬、氨基酸代谢、三羧酸循环等信号通路, 发挥抗炎、维持供能、调控机体稳态的作用。

关键词: 消痔丸; 痔病; 非靶向代谢组学; 生物标志物; 甘油磷脂代谢; 花生四烯酸代谢; 自噬; 三羧酸循环

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)07-1873-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.07.004

Mechanism of Xiaozhi Pills on croton oil-induced anal swelling hemorrhoids based on non-targeted metabolomics

QIAN Shuangxi¹, HAN Yanqi^{2,3}, GONG Pengfei¹, LI Yapeng¹, LI Xin^{2,3}, LU Peng^{2,3}, XU Jun^{2,3}, ZHAO Zhuanyou^{2,3}, CHAI Guolin¹, ZHANG Tiejun^{2,3}

1. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730000, China

2. State Key Laboratory of Drugability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Huguang TCM Technology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300462, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Xiaozhi Pills on croton oil-induced anal swelling hemorrhoids model rats by non-targeted metabolomics technology. **Methods** Rats model of anal swelling hemorrhoids induced by croton oil was established. The plasma of control group, model group, and Xiaozhi Pills group was taken, and the plasma metabolic fingerprint spectrum was established by UPLC-Q-TOF-MS method. Combined with HMDB and KEGG, the related metabolic pathways were enriched and the intervention effect of Xiaozhi Pills on biomarkers was analyzed. **Results** A total of 35 potential biomarkers of hemorrhoids were screened and identified, involving 11 metabolic pathways such as glycerophospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, autophagy, tricarboxylic acid cycle, arginine and proline metabolism, etc. After the intervention of Xiaozhi Pills, 23 biomarkers were

收稿日期: 2026-03-27

基金项目: 国有资本经营预算支持省属企业科研项目(2024GZ031)

作者简介: 钱双喜, 高级工程师, 主要从事中药学相关研究。E-mail: 287687328@qq.com

#共同第一作者: 韩彦琪, 副研究员, 主要从事中药药效及作用机制研究。E-mail: hanyq@tjipr.com

*通信作者: 柴国林, 正高级工程师, 主要从事中药学研究。E-mail: 3136174195@qq.com

张铁军, 研究员, 主要从事中药新药研发及大品种培育。E-mail: zhangtj@tjipr.com

significantly regulated. **Conclusion** Xiaozhi Pills exerts anti-inflammatory, energy maintenance, and homeostasis regulation effects by regulating signaling pathways such as glycerophospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, autophagy, amino acid metabolism, and the tricarboxylic acid cycle.

Key words: Xiaozhi Pills; hemorrhoids; non-targeted metabolomics; biomarker; glycerophospholipid metabolism; arachidonic acid metabolism; autophagy; tricarboxylic acid cycle

痔疮是一种常见的肛门直肠疾病,定义为痔垫增大和有症状的脱垂,临床表现为局部炎症、肿痛、便血、脱出等症状,大约 25% 的普通人群一生中都会受到痔疮的影响^[1-2]。痔病病程漫长,诱发因素多种多样,如摄入纤维量过低、长期久坐或久蹲、蹲便时间长、肥胖和缺乏足够运动等^[3]。目前痔病发病机制主要有肛垫下移学说、静脉曲张学说、血管增生学说等,肛垫下移学说认为,当肛垫固定支持结构被破坏时,肛垫就会下移并脱出,从而形成痔;静脉曲张学说认为直肠下段黏膜下与肛管皮肤下的静脉丛瘀血、扩张和屈曲形成静脉团从而形成痔疮;研究者发现痔是一种血管瘤样海绵状组织,血管增生学说提出肛肠区新血管的生成是引起痔病的重要原因^[4-5]。消痔丸是由地榆(炒炭)、牡丹皮、三颗针皮(炒炭)、大黄(酒炒)、黄芪、白及、槐角(蜜炙)、防己、白术(炒)、当归(酒炒)、火麻仁(炒黄)及动物大肠 12 味中药组成的中药复方制剂,具有消肿生肌、清热润便、补气固脱、止血、止痛的功效,主要用于痔疾肿痛、便秘出血、脱肛不收及肠风下血,积滞不化等症,主治痔疮。课题组前期研究发现,消痔丸对巴豆油诱导的肛门肿胀类痔模型及醋酸诱导的肛门溃疡类痔模型治疗作用显著,其对痔疮引起的肛门肿胀、黏膜溃疡、炎症反应、直肠血管通透性增加等均有很好的治疗效果^[6-7]。本研究在药效实验的基础上,采用代谢组学的研究方法,借助 UPLC/Q-TOF MS 方法,建立痔病大鼠血浆代谢指纹图谱;并结合主成分分析进行模式识别,寻找与痔病相关的潜在生物标志物,探讨痔病相关的内在代谢循环途径和信号通路。通过比较不同组别的潜在生物标志物的种类及含量变化,探究消痔丸治疗痔病的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要试剂及仪器

消痔丸(批号 210712, 0.04 g/丸,兰州佛慈制药股份有限公司);巴豆油(批号 C13225401)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;质谱级甲醇

(CAS 67-56-1)、乙腈(CAS 75-05-8)购自 CNW Technologies;质谱级乙酸铵(CAS 631-61-8)购自 SIGMA-ALDRICH;质谱级氨水(CAS 1336-21-6)购自 Fisher Chemical;超纯水购自屈臣氏。

氮吹仪(上海登晨生物医疗科技有限公司,型号 MD200-1A);ACQUITY UPLC System I Class (Waters)超高效液相色谱仪、高分辨率质谱仪 Triple TOF 6600 (SCIEX, Framingham, MA, USA);天平(型号 BSA124S-CW),Sartorius 公司;超声仪(型号 PS-60AL),深圳市雷德邦电子有限公司。

1.2 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量(190±10)g,北京斯贝福生物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2019-0010,天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准[IACUC: No.2022081601],动物饲养环境(23±3)℃,12 h 昼夜交替,自由进食饮水。

2 方法

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠适应喂养 1 周后,随机分为对照组、模型组、消痔丸(1.62 g/kg)组^[6],每组 10 只。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积 0.1% CMC-Na 溶液,1 次/d,连续 7 d。第 4 天给药 1 h 后,除对照组外,用浸吸 0.16 mL 巴豆油混合液的棉签插入已浅麻醉的大鼠肛门保持 13 s,棉签取出后在肛周均匀涂抹 1 圈,6 h 后可见大鼠肛周组织充血肿胀并有炎性渗出,即造模成功^[5]。造模 72 h 后,麻醉大鼠,腹主动脉取血于肝素钠抗凝采血管中,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,分离得到血浆样品,-80℃保存。

2.2 血浆及质控(QC)样本处理

将对照组(C)、模型组(M)、消痔丸(1.62 g/kg)组血液样本取出,4℃解冻,分别取 45 μL 于 EP 管,加入 180 μL 乙腈,涡旋 1 min,14 000 r/min、4℃离心 15 min,每个样本取 45 μL 混合作为 QC,每个样本和 QC 取 135 μL 于 96 孔板中,氮气吹干,加入 70 μL 50%乙腈复溶,14 000 r/min、4℃离心

15 min, 取上清于进样瓶中上机检测。

2.3 LC-MS 分析色谱条件

使用 ACQUITY UPLC System I Class (Waters, UK) 超高效液相色谱仪, 通过 ACQUITY UPLC T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m, Waters, UK) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相, 含 5 mmol/L 乙酸铵和 5 mmol/L 乙酸, B 相为乙腈。梯度洗脱: 0~1 min, 2% B; 1~5 min, 2%~70% B; 5~7.5 min, 70%~90% B; 7.5~9 min, 90%~100% B; 9~12 min, 100% B; 12~12.5 min, 100%~2% B; 12.5~15 min, 2% B。体积流量 0.3 mL/min, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样体积: 2 μ L。

2.4 LC-MS 分析质谱条件

采集高分辨率质谱仪 Triple TOF 6600 (SCIEX, Framingham, USA) 飞行时间质谱。每个样本进行 1 次正离子模式采集和 1 次负离子模式采集。离子源的遮蔽气压为 206.8 kPa, 气体 1 (辅气) 和气体 2 (鞘气) 压力均设置为 413.7 kPa。源温度 500 $^{\circ}$ C。正离子模式时电压为正 5 000 V, 负离子模式时为 -4 500 V。采集数据的模式为 IDA (信息依赖性采集) 模式。在一个采集循环中, 一级采集范围为 m/z 60~1 200, 一级采集时间为 150 ms, 然后从一级图谱中挑选信号积累强度超过 100 的前 12 个信号离子进行二级碎裂扫描。动态排除设置 4 s。在采集过程中, 每间隔 20 个样本进行 1 次仪器准确度校正。同时, 每间隔 10 个样本进行 1 次 QC 品的扫描。用 QC 间的质量差距来校正整批实验的系统误差。

2.5 数据质控

代谢组具有易受外界因素干扰且变化迅速的特点, 因此, 数据质量控制是获得可重复性和准确性代谢组结果的必要步骤。基于峰面积值来计算 QC 样本之间的 Pearson 相关系数, QC 样本相关性越高 (R^2 越接近于 1) 说明整个检测过程稳定性越好, 数据质量越高。

2.6 数据处理

结合由标准品构建的高质量 mzCloud 数据库搭配 mzVault 及 MassList 数据库, 对分子特征峰进行匹配鉴定, 能够尽可能多地鉴定到生物体系中的代谢物, 最大程度反映总代谢物的信息。原始数据使用 CD 数据处理软件进行数据搜库预处理, 首先通过保留时间、质荷比对数据进行简单筛选并进行峰对齐; 然后通过高分辨 XIC 图中的质荷比确定化合物的精确相对分子质量, 根据质量数偏差、加合物

离子信息进行分子式预测; 通过与 mzCloud 数据库中每个化合物的碎片离子、碰撞能等信息进行匹配, 对代谢物进行鉴定, 然后选取 QC 样本中变异系数 (CV) 值小于 30%^[8] 的化合物作为最终的鉴定结果。使用 MetaX 软件^[9] 对数据进行对数转换及中心化格式化处理, 然后对代谢物进行多元统计分析, 包括主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 等, 揭示不同组别代谢物的差异。采用单变量统计分析中的 t 检验 (计算 P 值) 和差异倍数 (fold change, FC) 对模型组与对照组间的代谢物差异进行评估, 以 $FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 , $P < 0.01$ 且变量投影重要性 (VIP) > 2.0 为阈值, 筛选出潜在的生物标志物。利用 MetaboAnalyst 平台的通路模块对鉴定得到的血液代谢标记物的相关代谢通路进行分析, 将 $P < 0.05$ 的代谢通路作为潜在靶标代谢通路。

2.7 统计分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异性采用 GraphPad Prism 8 统计学软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 实验质控结果

基于峰面积值计算 QC 样本之间的 Pearson 相关系数, QC 样本相关性越高 (R^2 越接近于 1) 说明整个检测过程稳定性越好, 数据质量越高。QC 样本相关性见表 1。通过结果可判断, 各相关系数均大于 0.99, 质控合格。

3.2 血浆代谢指纹图谱的建立

通过 UPLC-Q-TOF-MS, 根据以上实验方法条件获得不同组别大鼠血液样品在正、负离子模式下的代谢指纹谱, 如图 1 所示。

3.3 生物标志物的筛选及鉴定

将模型组和对照组、消痔丸组和模型组、消痔丸组和对照组大鼠血浆的质谱数据进行 PLS-DA、OPLS-DA 分析。如图 2 火山图结果所示, 共筛选出 5 132 个差异代谢物, 模型组与对照组之间 49 个代谢物上调, 40 个代谢物下调。消痔丸组与模型组之间 54 个代谢物上调, 33 个代谢物下调。消痔丸组与对照组之间 102 个代谢物上调, 85 个代谢物下调。图 3、4 中分别展示了 PLS-DA、OPLS-DA 模型, 分析结果表明对照组和模型组在得分图中能完全分开, 说明两组大鼠血液代谢产物差异明显。选择 VIP 值 > 2.0 且 $P < 0.01$, $FC \leq 0.67$ 或 $FC \geq 1.5$ 的变量, 通过 HMDB 结合二级碎片离子信息, 对潜在

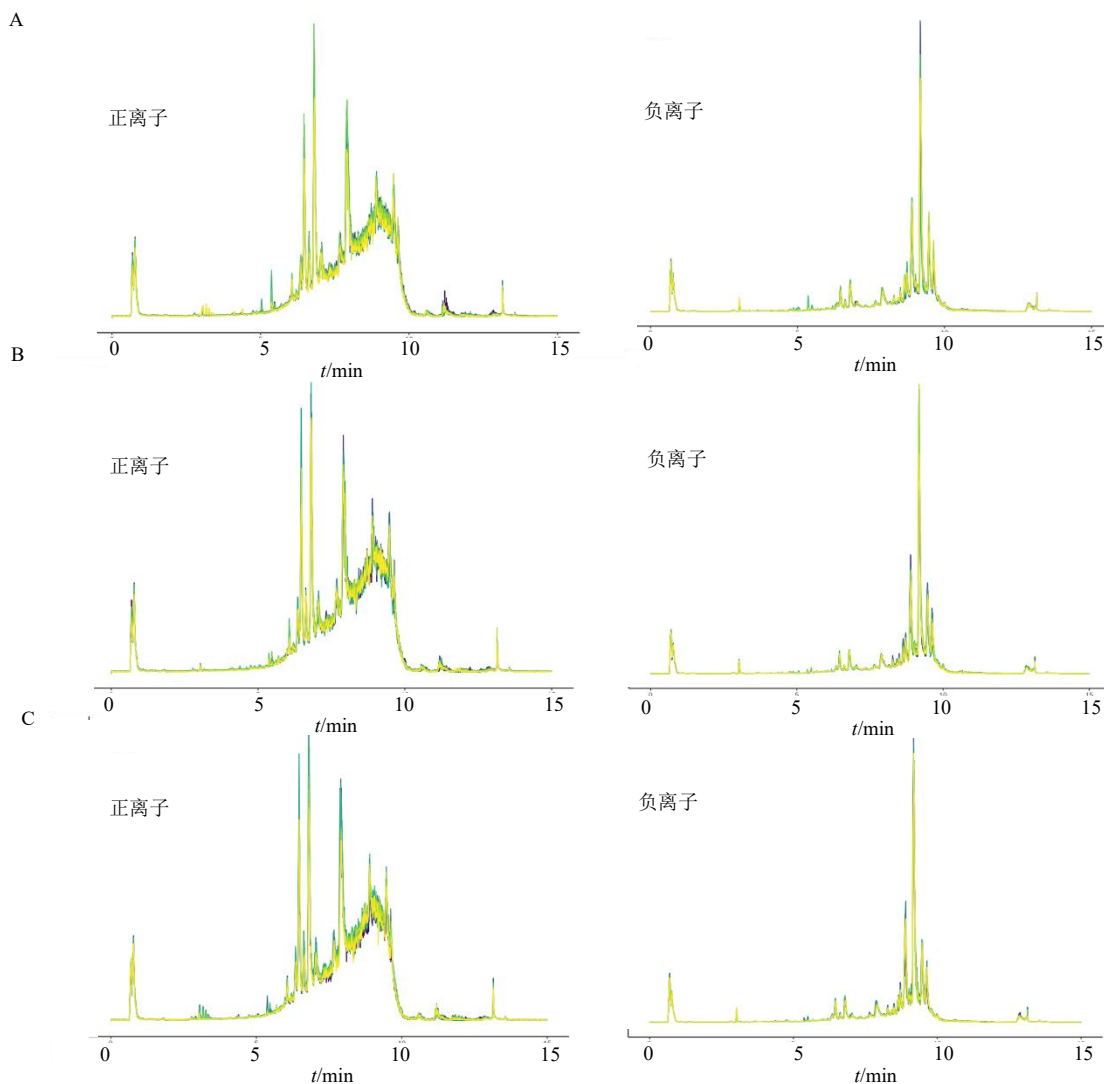
表 1 QC 样本间 Pearson 相关系数

Table 1 Pearson correlation coefficient between QC samples

样品	QC1_pos	QC2_pos	QC3_pos	QC4_pos	QC5_pos
QC1_pos	1	0.995 7	0.998 9	0.999 6	0.998 5
QC2_pos	0.995 7	1	0.995 5	0.996 6	0.999 1
QC3_pos	0.998 9	0.995 5	1	0.998 6	0.998 1
QC4_pos	0.999 6	0.996 6	0.998 6	1	0.998 6
QC5_pos	0.998 5	0.999 1	0.998 1	0.998 6	1
样品	QC1_neg	QC2_neg	QC3_neg	QC4_neg	QC5_neg
QC1_neg	1	0.999 6	0.999 9	0.998 8	0.999 9
QC2_neg	0.999 6	1	0.999 8	0.999 4	0.999 6
QC3_neg	0.999 9	0.999 8	1	0.999 2	0.999 8
QC4_neg	0.998 9	0.999 4	0.999 2	1	0.998 4
QC5_neg	0.999 9	0.999 6	0.999 8	0.998 4	1

pos-正离子，neg-负离子。

pos - positive ion, neg - negative ion.



A-对照组，B-模型组，C-消痔丸组。

A-control group, B-model group, C-Xiaozhi Pills group.

图 1 大鼠血浆代谢指纹图谱

Fig. 1 Metabolic fingerprinting profiles of rat plasma

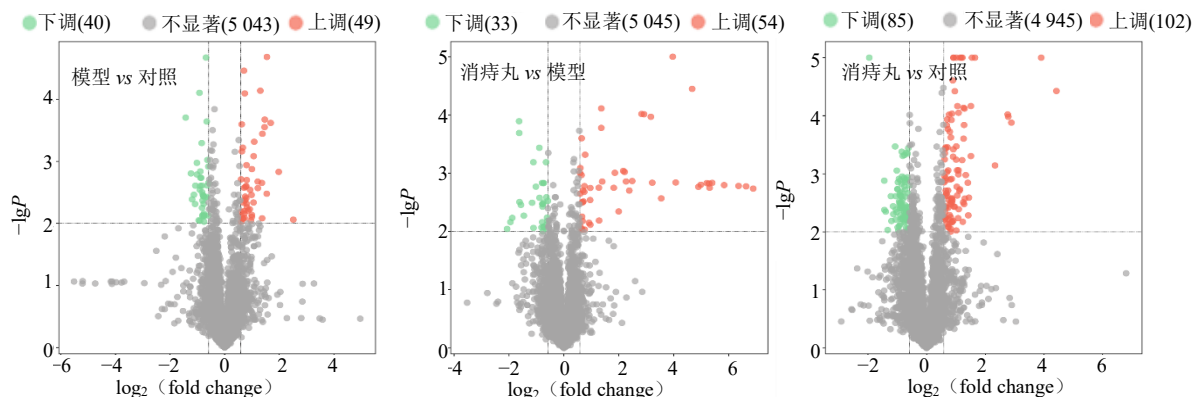


图 2 大鼠血浆代谢物火山图

Fig. 2 Volcano plots for metabolites in the plasma of rats

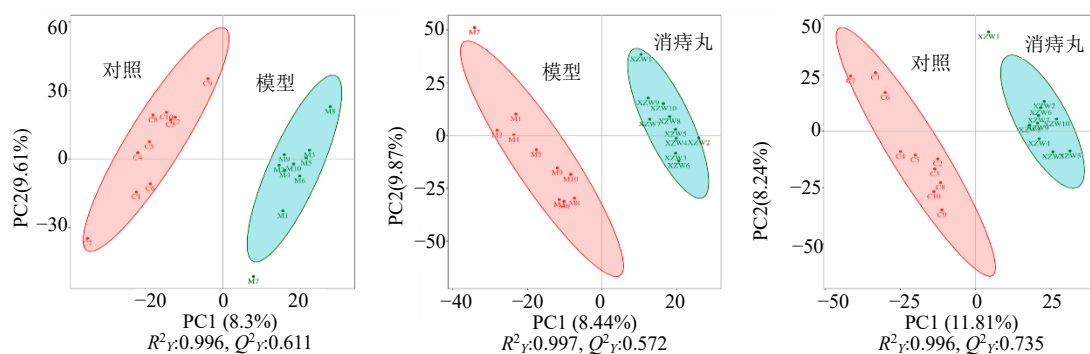


图 3 PLS-DA 判别分析模型得分图

Fig. 3 Score plot of PLS-DA discriminant analysis

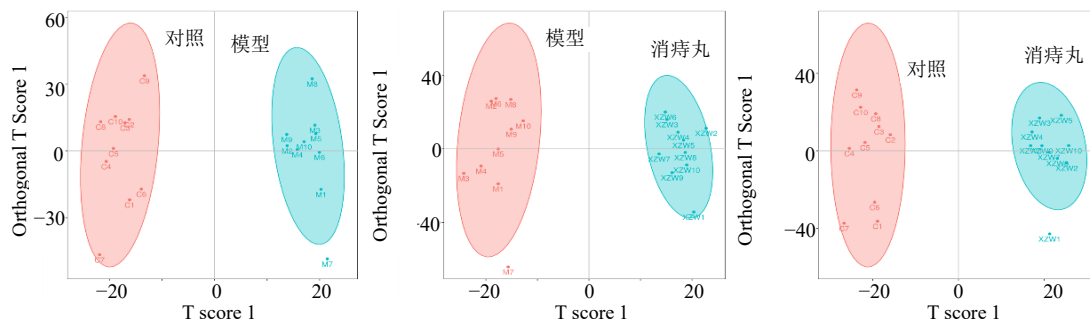


图 4 OPLS-DA 判别分析模型得分图

Fig. 4 Score plot of OPLS-DA discriminant analysis

差异代谢标记物进行筛选鉴定，最终表征了 35 个血液差异代谢标记物，其中正离子模式下 17 个，负离子模式下 18 个，对其分析发现其中 15 个代谢差异物表现为不同程度的下调，20 个表现为不同程度的上调，见表 2。

3.4 消痔丸对痔病治疗作用的代谢组学分析

以代谢组学为分析手段，以大鼠血液中的所有小分子代谢产物为分析对象，从整体上考察消痔丸

的干预效果，更为直观的看出消痔丸的治疗作用。对对照组、模型组和消痔丸给药组的数据进行 PLS-DA 分析，结果如图 5 所示，消痔丸组大鼠的整体状态明显远离模型组，向对照组靠拢，表明消痔丸对类痔模型大鼠的治疗作用明显。

消痔丸对痔病模型大鼠的治疗作用可以通过对已鉴定生物标志物的调节来得到体现。对生物标志物的血液相对含量研究发现，与模型组比较，消

表 2 血浆中差异代谢物鉴定结果

Table 2 Identification of differential metabolites in plasma

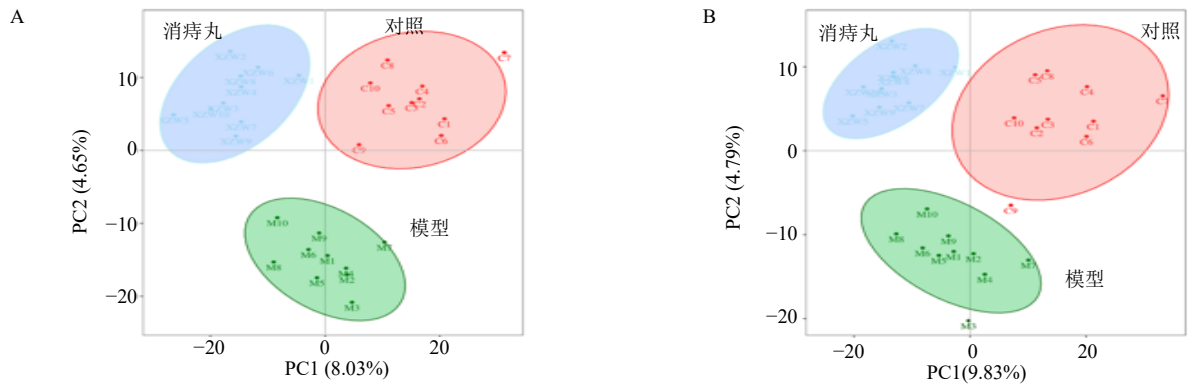
序号	t_R/min	代谢物	离子模式	m/z	分子式	FC	P 值	VIP	趋势	
									模型 vs 对照	消痔丸 vs 模型
1	2.56	脱氧尿苷	$[\text{M}-\text{H}]^-$	227.066 8	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$	0.63	0.000 2	2.88	下调	上调
2	2.97	20-羟基白三烯 E4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	456.243 9	$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_6\text{S}$	0.53	0.000 1	3.04	下调	上调
3	3.04	富马酸/延胡索酸	$[\text{M}+\text{HAC}-\text{H}]^-$	175.024 5	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	1.64	0.002 7	2.50	上调	下调
4	3.04	三氯乙醇葡萄糖苷酸	$[\text{M}-\text{H}]^-$	322.950 2	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{O}_7$	1.62	0.004 7	2.37	上调	下调
5	3.04	2-氧代嘌呤	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	196.069 3	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$	1.69	0.003 7	2.43	上调	下调
6	3.04	尿苷 2',3'-环磷酸	$[\text{M}+\text{K}]^+$	344.990 6	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$	1.73	0.003 9	2.40	上调	下调
7	3.29	同型半胱氨酸	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	158.025 9	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$	0.37	0.000 2	2.91	下调	无显著差异
8	4.24	维生素 K2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	477.264 1	$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_5$	2.61	0.000 4	2.86	上调	下调
9	6.00	溶血磷脂酸 (22:6/0:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	481.235 2	$\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	0.56	0.002 5	2.55	下调	无显著差异
10	6.01	3-磷酸甘油	$[\text{M}+\text{H}]^+$	173.019 9	$\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$	0.47	0.004 9	2.41	下调	上调
11	6.02	维生素 A	$[\text{M}+\text{H}]^+$	287.235 4	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	0.52	0.008 9	2.25	下调	上调
12	6.02	溶血磷脂酸 (20:4/0:0)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	459.249 0	$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	0.57	0.007 6	2.27	下调	无显著差异
13	6.02	溶血磷脂酰乙醇胺 (0:0/16:1)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	452.275 6	$\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{NO}_7\text{P}$	0.53	0.009 1	2.24	下调	上调
14	6.02	溶血磷脂酰乙醇胺 (0:0/18:3)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	476.275 3	$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{NO}_7\text{P}$	0.64	0.002 5	2.55	下调	无显著差异
15	6.03	溶血磷脂酸 (0:0/18:2)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	435.248 3	$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	0.55	0.001 9	2.62	下调	上调
16	6.22	溶血磷脂酸 (16:0/0:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	409.235 0	$\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	0.58	0.003 5	2.45	下调	上调
17	6.23	环状磷脂酸 (16:0/0:0)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	393.238 8	$\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{P}$	0.59	0.003 7	2.43	下调	无显著差异
18	6.38	溶血磷脂酸 (18:1)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	435.250 2	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{P}$	0.56	0.000 5	2.78	下调	无显著差异
19	7.09	磷脂酰丝氨酸 (16:0/16:0)	$[2\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	489.324 5	$\text{C}_{38}\text{H}_{74}\text{NO}_{10}\text{P}$	0.56	0.005 6	2.33	下调	上调
20	7.23	环状磷脂酸 (18:0/0:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	419.255 0	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{P}$	0.62	0.000 0	3.13	下调	上调
21	8.35	3 α ,7 α -二羟基-5 β -胆甾烷	$[\text{M}+\text{H}]^+$	405.370 9	$\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2$	1.89	0.005 9	2.40	上调	下调
22	8.44	三酰甘油 (18:1/22:5/18:1)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	931.777 6	$\text{C}_{61}\text{H}_{104}\text{O}_6$	1.74	0.001 2	2.63	上调	下调
23	8.63	神经节苷脂 GM3 (d18:1/16:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 151.709 8	$\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{N}_2\text{O}_{21}$	1.58	0.000 6	2.74	上调	无显著差异
24	8.80	磷脂酰乙醇胺 (14:0/14:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	634.441 1	$\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{NO}_8\text{P}$	1.99	0.007 3	2.30	上调	上调
25	8.81	心磷脂 (18:1/18:2/18:2/18:2)	$[\text{M}+2\text{Cl}]^{2-}$	781.489 4	$\text{C}_{81}\text{H}_{144}\text{O}_{17}\text{P}_2$	1.98	0.003 5	2.47	上调	无显著差异
26	9.08	神经节苷脂 GM3 (d18:1/18:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 179.740 5	$\text{C}_{59}\text{H}_{108}\text{N}_2\text{O}_{21}$	2.09	0.000 8	2.80	上调	无显著差异
27	9.11	磷脂酰肌醇二磷酸 (16:0/18:2)	$[\text{M}-2\text{H}+\text{NH}_4]^+$	1 010.47 99	$\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{O}_{19}\text{P}_3$	1.67	0.000 1	2.99	上调	下调
28	9.12	3-O-磺基半乳糖神经酰胺	$[\text{M}+\text{K}]^+$	928.589 2	$\text{C}_{48}\text{H}_{91}\text{NO}_{11}\text{S}$	1.54	0.000 3	2.92	上调	下调
29	9.12	磷脂酰肌醇 (18:0/22:6)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	909.555 6	$\text{C}_{49}\text{H}_{83}\text{O}_{13}\text{P}$	1.63	0.000 0	3.10	上调	无显著差异
30	9.30	三酰甘油 (15:0/20:1/18:0)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	859.809 4	$\text{C}_{56}\text{H}_{108}\text{O}_5$	1.52	0.009 4	2.21	上调	下调
31	9.30	磷脂酰肌醇 (18:1/18:1)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	861.554 9	$\text{C}_{45}\text{H}_{83}\text{O}_{13}\text{P}$	1.59	0.008 4	2.31	上调	无显著差异
32	9.31	磷脂酰胆碱 (22:5/22:6)	$[\text{M}+\text{H}]^+$	880.590 1	$\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$	1.55	0.000 7	2.72	上调	下调
33	9.45	磷脂酰胆碱 (22:4/22:4)	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	908.610 3	$\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{NO}_8\text{P}$	1.91	0.002 9	2.56	上调	下调
34	9.55	磷脂酰肌醇 (18:0/22:4)	$[\text{M}-\text{H}]^-$	913.583 3	$\text{C}_{49}\text{H}_{87}\text{O}_{13}\text{P}$	1.81	0.006 2	2.35	上调	无显著差异
35	9.64	4- α -甲基-5- α -胆甾醇-7-en-3- β -醇	$[\text{M}+\text{K}]^+$	439.337 0	$\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$	3.95	0.001 5	2.78	上调	下调

痔丸组对 23 个生物标志物产生了显著调节作用, 见图 6。包括脱氧尿苷、20-羟基白三烯 E4、富马酸、三氯乙醇葡萄糖苷酸、2-氧代嘌呤、尿苷 2',3'-环磷酸、维生素 K2、3-磷酸甘油、维生素 A、溶血磷脂酰乙醇胺 (0:0/16:1)、溶血磷脂酸 (0:0/18:2)、溶血磷脂酸 (16:0/0:0)、磷脂酰丝氨酸 (16:0/16:0)、环状磷脂酸 (18:0/0:0)、3 α ,7 α -二羟基-5 β -胆甾烷、磷脂酰乙醇胺 (14:0/14:0)、磷脂

酰肌醇二磷酸 (16:0/18:2)、3-O-磺基半乳糖神经酰胺、三酰甘油 (18:1/22:5/18:1)、三酰甘油 (15:0/20:1/18:0)、磷脂酰胆碱 (22:5/22:6)、磷脂酰胆碱 (22:4/22:4)、4- α -甲基-5- α -胆甾醇-7-en-3- β -醇, 见图 6、7。

3.5 消痔丸干预痔病的代谢通路分析

对表 2 中鉴定的 35 个血液代谢生物标记物的相关代谢通路进行拓扑特征分析, 共富集到相关信

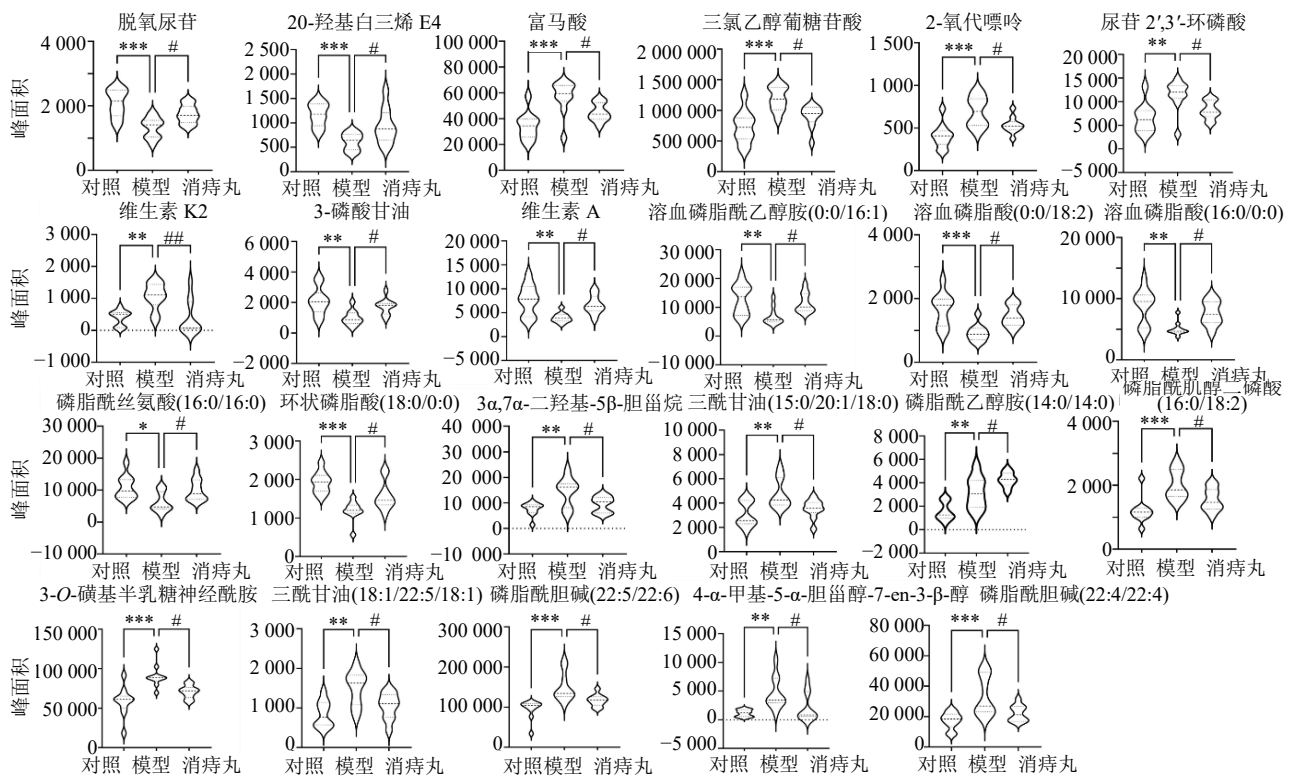


A-正离子模式, B-负离子模式。

A-positive ion mode, B-negative ion mode.

图 5 对照组、模型组、消痔丸组 PLS-DA 分析图

Fig. 5 PLS-DA analysis diagram of control group, model group, and Xiaozhi pills group

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.010$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.图 6 消痔丸调控的 23 个生物标记物相对峰面积图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 6 Relative peak areas of 23 biomarkers regulated by Xiaozhi Pills ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

号通路 28 条, $P < 0.05$ 的有 11 条, 主要包括甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、甘油酯代谢、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定生物合成、自噬的调节、柠檬酸循环 (TCA 循环)、GnRH 信号通路、嘧啶代谢、FcγR 介导的吞噬作用、FcεRI 信号通路等, 见表 3。

4 讨论

本研究在药效实验的基础上, 采用非靶向代谢组学研究方法, 探究消痔丸治疗痔病的作用机制。通过对对照组与模型组间的内源性小分子进行比较分析, 获得 35 个痔病生物标志物, 再通过与消痔

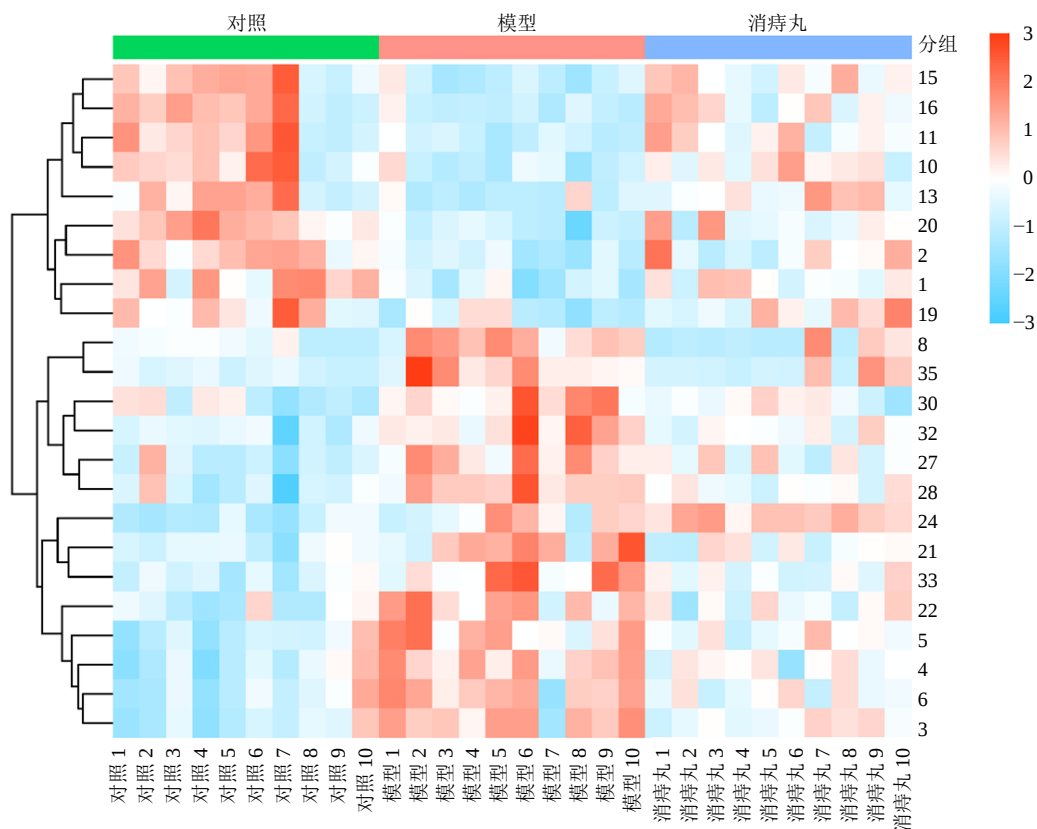


图 7 消痔丸干预后 23 个差异代谢标志物的热图分析
Fig. 7 Heatmap analysis of 23 differential metabolic markers significantly intervened by Xiaozhi Pills

表 3 信号通路信息

Table 3 Pathway information table

ID	通路中文名	P 值	生物标记物 ID
hsa00564	甘油磷脂代谢	1.09×10^{-6}	HMDB00126、HMDB08682、HMDB08821、HMDB07852、HMDB00614
hsa00590	花生四烯酸代谢	0.004 0	HMDB08682、HMDB12639
hsa01100	代谢途径	0.005 5	HMDB00126、HMDB00134、HMDB08682、HMDB08821、HMDB07852、HMDB00305、HMDB30017、HMDB00614、HMDB04225、HMDB06893、HMDB12318
hsa00561	甘油酯代谢	0.008 6	HMDB00126、HMDB07852
hsa00563	糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定生物合成	0.013 3	HMDB08821
hsa04140	自噬的调节	0.022 1	HMDB08821
hsa00020	柠檬酸循环（TCA 循环）	0.025 8	HMDB00134
hsa04912	GnRH 信号通路	0.026 5	HMDB07852
hsa00240	嘧啶代谢	0.027 5	HMDB00012、HMDB11640
hsa04666	FcγR 介导的吞噬作用	0.035 2	HMDB07852
hsa00330	精氨酸和脯氨酸代谢	0.043 8	HMDB04225

丸给药组生物标志物的表达情况，发现消痔丸对其中 23 个标志物有显著调控作用，对标志物进行 KEGG 通路富集分析发现，其调控了 11 条关键信号通路，主要包括甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、

自噬的调节、精氨酸和脯氨酸代谢、三羧酸循环、甘油酯代谢、FcγR 介导的吞噬作用等。
磷脂酰胆碱即卵磷脂，是细胞膜和各种细胞器（线粒体、内质网、细胞核等）膜的重要组分，胆碱

通过胆碱转运蛋白被吸收,并被胆碱激酶 α 磷酸化生成磷酸胆碱,磷酸胆碱被用于合成磷脂酰胆碱。在炎症疾病中,循环胆碱及其摄取增加,活化细胞(成纤维细胞和巨噬细胞)在炎症部位胆碱摄取增强^[10-11]。研究发现,Toll 样受体介导的巨噬细胞活化通过核因子- κ B (NF- κ B) 依赖性诱导胆碱转运蛋白,导致胆碱摄取上调,摄取的胆碱通过 Kennedy 途径迅速转化为磷脂酰胆碱,维持线粒体膜结构,维持 ATP 浓度,进而抑制 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路的激活,降低 AMPK 介导的线粒体自噬,最终促进 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体活化,白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 产生增加^[12]。磷脂酰丝氨酸是细胞膜中的主要成分之一,磷脂酰丝氨酸在细胞信号传导中起着重要作用^[13]。在正常的细胞凋亡过程中,磷脂酰丝氨酸会转移到细胞膜的外侧,作为细胞凋亡的信号分子,从而引导免疫细胞的吞噬和清除;在血液凝固过程中,磷脂酰丝氨酸作为凝血因子的辅助因子,参与血小板的聚集和血栓的形成;磷脂酰丝氨酸在免疫系统中起着识别和清除异常细胞的作用。溶血磷脂酸是一种生物活性磷脂分子,可以刺激平滑肌细胞收缩,参与血管收缩;能够促进血小板聚集,参与血液凝固过程;溶血磷脂酸与细胞膜上的溶血磷脂酸受体结合,激活下游信号通路,具有抗凋亡作用;可以促进细胞的迁移,参与组织修复和炎症反应^[14]。3-磷酸甘油在生物过程中主要通过糖酵解和磷酸甘油穿梭途径发挥作用,参与能量产生和脂肪合成等重要生理过程。实验发现,消痔丸可显著调控磷脂酰胆碱 (22:5/22:6)、磷脂酰胆碱 (22:4/22:4)、磷脂酰丝氨酸 (16:0/16:0)、溶血磷脂酸 LPA (0:0/18:2)、3-磷酸甘油等代谢产物,进而干预甘油磷脂代谢信号通路,发挥对痔病的治疗作用。

磷脂酰乙醇胺参与细胞内的多种信号通路,调节细胞的功能和反应。自噬是真核生物细胞内降解异常生物大分子或细胞器以循环营养物质的过程,在生物体生长发育调控中发挥重要作用,其异常将导致细胞失衡甚至死亡。细胞自噬需要自噬相关基因 (ATG) 的参与,包括 ATG1 蛋白激酶复合体、ATG9 复合体、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 复合体、ATG8-磷脂酰乙醇胺和 ATG5-ATG12 类泛素修饰系统等。细胞自噬参与了动物细胞的蛋白质稳态、葡萄糖代谢、脂质代谢、衰老等^[15-17]。本研究结果发

现,消痔丸干预后显著升高了模型大鼠血中磷脂酰乙醇胺的含量,进而调控自噬信号通路,发挥生物效应。

花生四烯酸由磷脂酶 A2 催化磷脂酰胆碱生成,是环氧合酶 (COX) 脂氧合酶 (LOX) 的重要底物,可催化生成炎症因子 PGE2 及白三烯类 (LTs),加强单核细胞和中性粒细胞的趋化作用、刺激淋巴细胞增殖和细胞因子的释放。20-羟基白三烯 E4 源自白三烯 E4 (LTE4) 的脂质氧化代谢产物, LTE4 是半胱氨酸白三烯 (CysLT), CysLT 是一类强效炎症介质。本研究发现,痔病大鼠血中代谢标志物磷脂酰胆碱含量显著上调、20-羟基白三烯 E4 显著下调,而消痔丸给药后均有显著回调趋势,推测消痔丸可能通过调节花生四烯酸代谢途径来发挥抗炎止痛作用。

精氨酸是体内一氧化氮 (NO) 合成的唯一底物,NO 是重要的免疫调节因子,可刺激 T 淋巴细胞的增殖,抑制肥大细胞反应性,诱导巨噬细胞凋亡^[18]。精氨酸除了介导 NO 信号通路发挥免疫调节作用外,还可通过 mTOR 途径促进免疫球蛋白的产生^[19],并下调 NF- κ B/My D88 相关基因表达,抑制 IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎因子的分泌,进而抑制炎症反应的产生^[20]。本研究发现,经消痔丸治疗后显著回调了精氨酸和脯氨酸代谢通路中模型大鼠血中生物标记物 2-氧代嘌呤的显著升高。

研究发现,细胞内富马酸水平的增加会诱导线粒体网络的重塑和线粒体衍生囊泡的产生,从而允许线粒体 DNA (mtDNA) 在细胞质中释放,触发环 GMP-AMP 合酶 (cGAS) -干扰素基因刺激剂 (STING) -TANK 结合激酶 1 (TBK1) 途径的激活并刺激炎症反应^[21]。本实验结果表明,模型组大鼠血中富马酸水平显著升高,而消痔丸显著回调了模型大鼠生物标记物富马酸的高表达。

综上,本研究通过代谢组学实验筛选确定了巴豆油诱导的大鼠肛门肿胀类痔模型的 35 个内源性代谢物为潜在生物标志物,消痔丸通过干预其中 23 个生物标志物的表达水平,调控甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、自噬、氨基酸代谢、三羧酸循等信号通路,发挥抗炎、维持供能、调控机体稳态的作用,从而达到对巴豆油诱导的肛门肿胀类痔大鼠模型的治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Devi V, Deswal G, Dass R, *et al.* Hemorrhoid disease: A review on treatment, clinical research and patent data [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2023, 23(6): e270423216271.
- [2] Kestřánek J. Hemorrhoid management in women: the role of tribenoside+ lidocaine [J]. *Drugs Context*, 2019, 8: 212602.
- [3] 黄泽森, 韩梁, 韩彦琪, 等. 中药防治痔病作用机制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(8): 1432-1442.
- [4] 杨亦婷, 陆炳楠, 刘赛靓, 等. 痔发病机制的分子生物学研究进展 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2022, 29(10): 1390-1394.
- [5] 谢逸轩, 王赛, 朱飞鹏, 等. 基于中西医临床病症特点的痔疮动物模型分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(7): 939-943.
- [6] 孙科, 李新, 韩彦琪, 等. 消痔丸对巴豆油致肛门肿胀模型大鼠的药效及作用机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6734-6742.
- [7] 李新, 华永晨, 王春芳, 等. 消痔丸对醋酸致肛门溃疡模型大鼠的作用机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(10): 2410-2417.
- [8] Dai W D, Xie D C, Lu M L, *et al.* Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach [J]. *Food Res Int*, 2017, 96: 40-45.
- [9] Wen B, Mei Z L, Zeng C W, *et al.* metaX: A flexible and comprehensive software for processing metabolomics data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 183.
- [10] Hellberg S, Silvola J M U, Kiugel M, *et al.* Type 2 diabetes enhances arterial uptake of choline in atherosclerotic mice: An imaging study with positron emission tomography tracer ^{18}F -fluoromethylcholine [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15: 26.
- [11] Schwarz T, Seidl C, Schiemann M, *et al.* Increased choline uptake in macrophages and prostate cancer cells does not allow for differentiation between benign and malignant prostate pathologies [J]. *Nucl Med Biol*, 2016, 43(6): 355-359.
- [12] Sanchez-Lopez E, Zhong Z Y, Stubelius A, *et al.* Choline uptake and metabolism modulate macrophage IL-1 β and IL-18 production [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(6): 1350-1362.
- [13] Vance J E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: Two metabolically related aminophospholipids [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(7): 1377-1387.
- [14] 王芳, 陈曦. 溶血磷脂酸信号在心血管疾病中的作用及潜在临床应用价值 [J]. 中华心血管病杂志, 2023, 51(7): 782-789.
- [15] Gupta S, Cassel S L, Sutterwala F S, *et al.* Regulation of the NLRP3 inflammasome by autophagy and mitophagy [J]. *Immunol Rev*, 2025, 329(1): e13410.
- [16] Kench U, Sologova S, Smolyarchuk E, *et al.* Pharmaceutical agents for targeting autophagy and their applications in clinics [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(10): 1355.
- [17] Jarocki M, Turek K, Saczko J, *et al.* Lipids associated with autophagy: Mechanisms and therapeutic targets [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 460.
- [18] Bingol K, Bruschweiler L, Li D W, *et al.* Customized metabolomics database for the analysis of NMR ^1H - ^1H TOCSY and ^{13}C - ^1H HSQC-TOCSY spectra of complex mixtures [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(11): 5494-5501.
- [19] Crutchfield C A, Thomas S N, Sokoll L J, *et al.* Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery [J]. *Clin Proteomics*, 2016, 13: 1.
- [20] Wu H, Chen Y, Li Q L, *et al.* Intervention effect of Qi-Yu-San-Long decoction on lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice: Insights from UPLC-QTOF/MS-based metabolic profiling [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1102-1103: 23-33.
- [21] Zecchini V, Paupe V, Herranz-Montoya I, *et al.* Fumarate induces vesicular release of mtDNA to drive innate immunity [J]. *Nature*, 2023, 615(7952): 499-506.

[责任编辑 高源]