

• 药理与临床 •

基于 GC-MS 技术的甘草总黄酮对伊立替康致肠炎小鼠的血浆代谢组学的影响研究

覃一枫^{1,2}, 魏 巍^{1,2}, 杭晓敏^{1,2}, 唐于平^{1,2}, 康 安^{1,2*}, 蒋建勤^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038

摘要: **目的** 评价甘草总黄酮对伊立替康致肠炎小鼠的药效学影响, 采用代谢组学方法分析伊立替康致肠炎模型小鼠血浆内源性代谢物的变化, 观察甘草总黄酮对差异性代谢物的调节作用, 对甘草总黄酮减轻伊立替康胃肠道毒性的作用机制进行初步探索。 **方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药 (环丙沙星) 组和甘草总黄酮组, ip 伊立替康制备肠炎模型, 通过体质量、结肠长度、病理观察评价甘草总黄酮减轻伊立替康胃肠道毒性的作用, 同时采用 GC-MS 技术进行非靶向代谢组学研究, 寻找伊立替康致肠炎小鼠血浆内变化的相关差异性代谢物, 并使用 MetaboAnalyst 软件构建代谢通路, 从代谢组学的角度评价甘草总黄酮对伊立替康的减毒效应。 **结果** 甘草总黄酮可显著改善伊立替康给药后导致的小鼠体质量减轻、结肠变短及肠道损伤等现象, 且有效地逆转了伊立替康导致的小鼠血浆代谢紊乱, 主要包括脂肪酸代谢、氨基酸代谢及糖类代谢, 显著回调了月桂酸、棕榈酸、亚油酸、油酸、 α -亚麻酸、棕榈酸单甘油酯和油酸单甘油酯等 7 种中长链脂肪酸。 **结论** 甘草总黄酮主要通过调节亚油酸及 α -亚麻酸代谢起到减轻伊立替康胃肠道毒性作用。

关键词: 甘草总黄酮; GC-MS; 伊立替康; 代谢组学; 差异性代谢物; 胃肠道毒性; 亚油酸; α -亚麻酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)24-5836-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.016

Plasma metabonomic study on glycyrrhiza flavonoids against irinotecan-induced colitis in mice based on GC-MS

QIN Yi-feng^{1,2}, WEI Wei^{1,2}, HANG Xiao-min^{1,2}, TANG Yu-ping^{1,2}, KANG An^{1,2}, JIANG Jian-qin^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

Abstract: **Objective** To make a preliminary investigation on the mechanism of the glycyrrhizin flavonoids alleviating the gastrointestinal toxicities of irinotecan. The pharmacological effects of glycyrrhizin flavonoids on the changes of endogenous differential metabolites of irinotecan-induced gastrointestinal toxicities were evaluated by using GC-MS metabolomics methods. **Methods** C57BL/6 mice were divided into normal group, model group, positive group (ciprofloxacin), and glycyrrhizin flavonoids group. Irinotecan induced colitis model were established in mice by intraperitoneally injected. The body weight, length of colon, and tissue sections were used to evaluate the effect of glycyrrhizin flavonoids on alleviating irinotecan-induced experimental colitis. Meanwhile, to evaluate the attenuating effect of glycyrrhizin flavonoids from the perspective of metabonomics, GC-MS was used for non-targeted metabolism in order to find out the change of related metabolites in plasma between experimental colitis mice and glycyrrhizin flavonoids treatment mice. Furthermore, metabolic pathway was constructed by MetaboAnalyst software to explore the potential mechanism. **Results** Glycyrrhizin flavonoids could significantly reduce the loss of body weight, colon shortening, and intestinal damage caused by irinotecan administration, and effectively reverse the irinotecan-induced plasma metabolic disorders in

收稿日期: 2018-04-28

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20171497); 江苏省高校自然科学基金面上项目 (16KJB360005)

作者简介: 覃一枫 (1993—), 女, 硕士, 研究方向为中药药理学与药动学。Tel: 15951082067 E-mail: yifengqin2016@163.com

*通信作者 康 安, 男, 副教授, 主要从事药物代谢动力学及药物分析研究。Tel: (025)85811053 E-mail: kanga@njucm.edu.cn

蒋建勤, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药及天然药物活性成分的提取分离、结构鉴定和天然产物结构改造、全合成研究。
Tel: (025)86185138 E-mail: njjq@aliyun.com

mice, including fatty acid metabolism, amino acid metabolism and carbohydrate metabolism, significantly callback seven long-chain fatty acids such as lauric acid, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, palmitic acid monoglyceride, and oleic acid monoglyceride. **Conclusion** Glycyrrhizin flavonoids could improve the irinotecan-induced experimental colitis in mice by regulating linoleic acid metabolism and alpha-linolenic acid metabolism.

Key words: glycyrrhizin flavonoids; GC-MS; irinotecan; metabolomics; differential metabolites; gastrointestinal toxicity; linoleic acid; alpha-linolenic acid

伊立替康 (irinotecan) 临床上主要用于治疗转移性结直肠癌, 但会伴随急性胆碱能综合征、中性粒细胞减少以及肠黏膜炎等副作用, 严重限制了伊立替康的治疗效果及临床应用^[1-2]。诱导肠上皮细胞凋亡是伊立替康产生胃肠道毒性的直接原因, 伊立替康及其代谢产物 SN-38 与拓扑异构酶 I 结合引发 DNA 损伤, 在发挥抗肿瘤作用的同时导致正常肠上皮细胞的凋亡从而产生炎症^[3]。临床上常用洛哌丁胺、奥曲肽、醋托啡烷、布地奈德等作为伊立替康胃肠毒性治疗药物, 但这些药物本身会导致一定的毒性和致死率^[4], 故近年来研究方向逐渐转向具有多靶点多途径的中药减毒。

甘草 *Glycyrrhiza Radix*, 又称乌拉尔甘草, 为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 及光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎; 其性味甘平, 归心、肺、脾、胃经, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效^[5]。基于其“解百药毒”的特性, 加上近年来国内外学者发现黄酮类化合物有较强的抗炎以及免疫调节活性^[6-7], 推测甘草总黄酮具有降低伊立替康胃肠道毒性的潜力。

代谢组学广泛应用于中医药研究, 可从整体上反映机体的代谢情况, 通过对内源性代谢物的分析, 寻找差异性代谢物, 对疾病诊断及药物干预后的治疗趋势具有指导意义^[8]。基于此, 本实验在确证甘草总黄酮降低伊立替康胃肠道毒性的基础上, 进一步采用 GC-MS/MS 技术分析正常小鼠、模型小鼠、给予阳性药小鼠以及给予甘草总黄酮小鼠的血浆代谢成分变化, 寻找并鉴定差异性代谢物, 同时构建相关代谢通路, 根据甘草总黄酮对差异性代谢物的干预作用, 初步探索甘草总黄酮对伊立替康致肠炎小鼠的可能作用机制, 以期为伊立替康致胃肠道毒性机制研究以及相关药物的开发提供参考。

1 材料

1.1 动物

清洁级 C57BL/6 小鼠, 雄性, 体质量 (20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司南京分

公司, 合格证号 SCXK (苏) 2017-0003。所有动物实验均按照中国药科大学动物饲养和使用指南进行, 并经中国药科大学实验动物伦理委员会批准。实验期间动物自由进食、饮水, 昼夜节律正常。

1.2 仪器与试剂

Agilent1220 液相色谱仪 (杭州瑞析科技有限公司); Thermo Scientific TSQ 8000 三重四极杆 GC-MS (美国 Thermo Scientific 公司); Allegra 64R 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Savant SPD1010 SpeedVac 离心浓缩仪 (美国 Thermo 公司); 盐酸伊立替康、L-(+)-乳酸、D-山梨醇、环丙沙星盐酸盐一水合物 (阿拉丁试剂公司); N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲氧胺盐、1,2-¹³C 肉豆蔻酸 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 甘草购自安徽省铜陵和田中药饮片股份有限公司 (产地内蒙古, 批号 20160516), 药材经南京中医药大学严辉副教授鉴定, 符合《中国药典》2015 年版项下标准, 蔗糖甘草苷 (批号 150614)、甘草苷 (批号 160819)、柚皮苷 (批号 151109)、甘草素 (批号 161030)、槲皮素 (批号 121103)、甘草查耳酮 A (批号 150407)、光甘草定 (批号 140617) 对照品购自成都普思生物科技股份有限公司 (质量分数 >98%); 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯 (Merck, Darmstadt, 德国); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 药品的制备

2.1.1 甘草总黄酮的提取 甘草总黄酮的提取参照已报道的文献方法^[9], 将甘草洗净烘干后粉碎, 以 1:10 (g/mL) 的料液比加入 95%乙醇置室温浸渍 24 h, 重复 3 次, 合并提取液, 抽滤, 滤液部分减压浓缩用热水溶解后以石油醚萃取 3 次, 弃有机层, 水层部分经醋酸乙酯萃取 3 次, 弃水层, 有机相部分再用 5%碳酸钠水溶液萃取 3 次, 随后碱水层用盐酸调至 pH 5~6, 最后经醋酸乙酯萃取 3 次后弃水层, 醋酸乙酯部分于 60 °C 恒温干燥得到棕黄色的甘草总黄酮。样品进行 HPLC 检测前, 用甲醇溶

解配制质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于分析。

2.1.2 HPLC 对照品的配制 精密称取甘草中黄酮类化合物甘草素、光甘草定、甘草苷、芹糖甘草苷、甘草查耳酮 A、槲皮素、柚皮苷用甲醇溶解配制质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。样品进样前, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 分析。

2.1.3 造模药伊立替康的配制 准确称取盐酸伊立替康 277 mg、*D*-山梨醇 0.225 g, 先将 10 mL 纯水与 34 μL *L*-(+)-乳酸混匀预热至 85 $^{\circ}\text{C}$ 制成乳酸溶液, 倒入盐酸伊立替康, 迅速加入纯水至 40 mL 充分搅拌至全部溶解, 随后加入 *D*-山梨醇搅拌直至溶解即为 6 mg/mL 的伊立替康溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用^[10]。

2.1.4 阳性药环丙沙星的配制 准确称取一定量的环丙沙星盐酸盐一水合物, 用 0.5%羧甲基纤维素钠配制为 3 mg/mL 的环丙沙星溶液。

2.1.5 甘草总黄酮药液的配制 将甘草总黄酮粉末混悬于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中配制成 17 mg/mL 的药液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2 HPLC 分析条件^[11]

色谱柱为 COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为 0.1%磷酸溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~20% B; 10~50 min, 20%~30% B; 50~73 min, 30%~50% B; 73~110 min, 50%~60% B; 110~120 min, 60%~80% B; 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 10 μL , 检测波长 254 nm。

2.3 动物的分组与给药

小鼠于实验开始前于实验室内适应性喂养 1 周, 每天给予标准的食物与饮用水。实验前 32 只 C57BL/6 小鼠按体质量随机分为 4 组, 分别为对照组、模型组、阳性药环丙沙星组和甘草总黄酮组。实验周期为 10 d, 实验期间每天给药前记录小鼠体质量, 环丙沙星组 ig 给予 40 mg/kg 环丙沙星^[12], 甘草总黄酮组 ig 给予甘草总黄酮 135 mg/kg (根据甘草临床等效剂量及甘草总黄酮提取率换算而来), 对照组与模型组小鼠 ig 给予等体积的溶剂。小鼠肠炎模型的制备与给药过程同时进行, 根据已有文献, 选择合适的造模剂量制备小鼠肠炎模型, 模拟了伊立替康治疗的基本情况, 即每天在 ig 给药 0.5 h 后按体质量 ip 40 mg/kg 伊立替康溶液以造模, 对照组

ip 等体积的溶剂^[13]。

2.4 样本的采集

第 10 天给药后, 小鼠眼眶采血于肝素化的离心管内, 即刻于 9 000 r/min 下离心 10 min, 吸取上清血浆置 1.5 mL 空白离心管中。小鼠采用脱颈椎的方式处死后解剖, 完整取出小鼠的结肠 (含回盲瓣), 观察结肠表面形态并拍照, 记录各组小鼠的结肠长度后弃回盲瓣, 用冰生理盐水冲洗肠内粪便及内容物, 取约 1 cm 的结肠置于 10%福尔马林中放置室温保存。肠组织病理切片经 HE 染色后, 采用光学显微镜对切片进行观察: 肠黏膜上皮细胞有无变性、坏死, 绒毛间质有无水肿; 黏膜固有层有无充血、水肿、炎细胞浸润等情况; 黏膜下层、肌层、浆膜层有无充血、水肿、炎细胞浸润等情况^[13]。生物样品均于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.5 血浆样品的处理

血浆样品于 GC-MS 分析前室温解冻, 解冻后移取血浆 50 μL , 加入含 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 1,2-¹³C 肉豆蔻酸的甲醇 200 μL , 用涡旋振荡器涡旋振荡 3 min, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、18 000 r/min 离心 10 min 沉蛋白, 吸取 100 μL 上清。随后, 血浆上清液置于台式低温离心浓缩仪于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下离心浓缩 2 h 至完全挥干。加入 30 μL 甲氧胺吡啶 (10 mg/mL) 溶解, 涡旋混匀 5 min 后, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 1.5 h (450 r/min), 加入 30 μL 衍生试剂 BSTFA 混匀对样品进行充分衍生化, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 0.5 h (450 r/min), 于 18 000 r/min 下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上清液进行分析, 进样体积为 1 μL 。

2.6 GC-MS 检测条件

色谱柱为 Thermo Scientific TraceGOLD TG-5MS 毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm); 进样量 1 μL ; 温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温条件为 0~1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$; 1~5 min, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 320 $^{\circ}\text{C}$; 分流体积流量 24.0 mL/min; 分流比 20; 温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 载体流 1.20 mL/min。ESI 源, 扫描方式: ExtractaBrite EI 离子源, 离子源温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 质谱传输管温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 扫描开始时间为 3.72 min, 质量扫描范围 m/z 50~500。

2.7 数据分析及统计检验

SPSS 19.0 软件用来对相关实验数据进行单因素方差分析, 所有实验数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 来表示; 使用软件 MS-DIAL 2.72 对获得的质谱数据进行导出处理及代谢物鉴定, Metaboanalysis 3.0 辅助寻找差异性代谢物及构建代谢通路, 采用 SIMCA-P 13.0

中正交偏最小二乘法 (OPLS-DA) 对所有内源性标记物进行多变量分析。

3 结果与分析

3.1 甘草总黄酮中主要化学成分的分析

根据重量法分析, 本实验中乌拉尔甘草总黄酮粗提物的质量分数为 3%, 与文献中报道总黄酮的质量分数 3.585% 相比略微偏低^[9]。采用外标法测得到所提甘草总黄酮中芹糖甘草苷、甘草苷、柚皮苷、甘草素、槲皮素、甘草查耳酮 A 和光甘草定的质量分数分别为 27.06、19.43、1.65、2.51、0.21、13.85、23.27 mg/g, 其中, 甘草苷的量约为 1.9%, 而文献中报道的甘草单煎液中甘草苷的量为 0.76%^[14], 表明本实验提取方法可取, 且经过萃取后黄酮类化合物得到了有效的富集。

3.2 甘草总黄酮对伊立替康胃肠道毒性的影响

甘草总黄酮、环丙沙星给药后对伊立替康致肠

炎小鼠的体质量、结肠长度及病理切片形态的影响见图 1。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠的体质量明显下降, 且结肠长度显著缩短, 甘草总黄酮可显著改善伊立替康给药后导致的小鼠体质量减轻、结肠变短的现象 ($P < 0.05$)。HE 染色病理切片结果表明, 正常小鼠肠壁结构完整, 绒毛排列有序, 黏膜完整; 模型组可见肠道结构紊乱, 绒毛长度明显缩短且形态弥散, 黏膜上皮中杯状细胞不可见, 肌层增厚, 组织出现炎性浸润的现象; 甘草总黄酮给药后肠道结构较为完整, 绒毛结构稍有弥散但仍有序, 长度较模型组有显著增加, 细胞排列较对照组紊乱但周围组织并无炎性浸润的现象, 基本保持正常, 与阳性药组的绒毛形态较为一致。结果表明, 本实验采用伊立替康制备的实验性结肠炎小鼠模型较为成功, 甘草总黄酮给药后显著降低了伊立替康导致的胃肠道毒性。

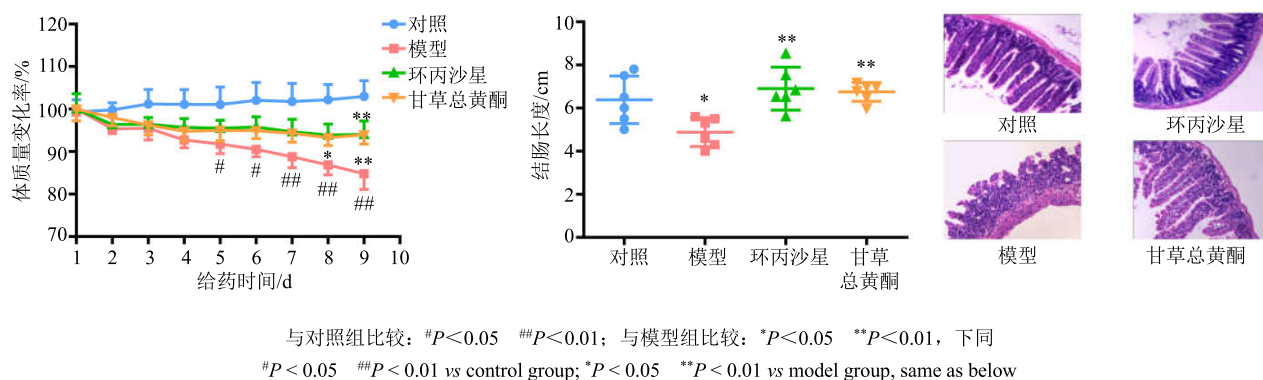


图 1 甘草总黄酮对伊立替康致实验性肠炎小鼠的作用 ($n = 8$)

Fig. 1 Effects of glycyrrhiza flavonoids on irinotecan-induced experimental colitis ($n = 8$)

3.3 OPLS-DA 分析结果

对于对照组和模型组的血浆样品 GC-MS 数据, 先通过 SIMCA-P 采用 OPLS-DA 对所有内源性代谢物进行多变量分析。结果显示本实验建立的正常和模型小鼠的血浆样品的 OPLS-DA 图中, 正离子模式下相关指数 R^2 为 0.938, 表明由正常和模型大鼠的血浆样品建立 OPLS-DA 模型较为真实可靠。同时, 为了观察阳性药环丙沙星和甘草总黄酮对伊立替康致实验性肠炎模型小鼠的影响, 对各组的血浆样品数据进行了 OPLS-DA 分析。如图 2 所示, 模型组和各给药组的 OPLS-DA 得分图得到了完全的分离, 且阳性药组和甘草总黄酮组到对照组的相对距离较模型组到对照组的距离近, 表明阳性药环丙沙星和甘草总黄酮对肠炎模型导致的内源性代谢物的紊乱均有较好的回调作用, 其中, 甘草总黄酮组

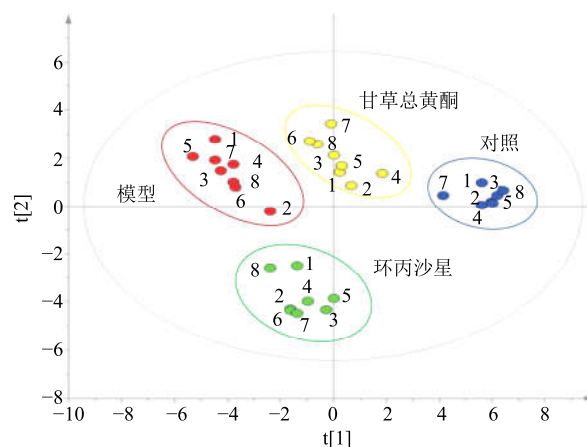


图 2 各组血浆样品在正离子模式下的 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 OPLS-DA score plot of plasma samples in each group

到对照组的相对距离短于阳性药组但并不显著,表明甘草总黄酮有效地逆转了伊立替康导致的小鼠血浆代谢紊乱,与药效学结果评价一致。

3.4 甘草总黄酮对肠炎小鼠血浆差异性代谢物的干预作用

为寻找差异性代谢物,首先通过 SIMCA-P 软件得到对照组和模型组中各内源性代谢物的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值的大小,保留 VIP > 1 的代谢物;再使用 Metaboanalysis 3.0 软件找出对照组和模型组中 Fold Change > 1.5 的代谢物;最后采用 SPSS 19.0 软件对对照组和模型组中的潜在差异性标记物,进行单因素方差分析检验,保留 $P < 0.05$ 的代谢物。同时满足 VIP > 1、Fold Change > 1.5 和 $P < 0.05$ 这 3 个条

件的即视为与疾病密切相关的差异性代谢物,本实验在血浆样品中共找到 20 个差异性代谢物,主要有中长链脂肪酸:月桂酸、棕榈酸、亚油酸、油酸、 α -亚麻酸、棕榈酸单甘油酯和油酸单甘油酯;氨基酸: β -丙氨酸、甲硫氨酸、 L -羟脯氨酸、酪氨酸和色氨酸,以及柠檬酸、谷氨酸盐、蔗糖酸钙、苯三酚、塔格糖、肌醇、麦芽糖和异豆甾烷醇。甘草总黄酮对部分差异性代谢物的调节作用见图 3。与对照组相比,模型组中的差异性标记物均有下调的趋势,而给药后,甘草总黄酮显著回调了月桂酸、棕榈酸、亚油酸、油酸、 α -亚麻酸、棕榈酸单甘油酯和油酸单甘油酯等 7 种中长链脂肪酸,并对 β -丙氨酸有较显著的影响,不同程度地改善了紊乱的内源性代谢物。

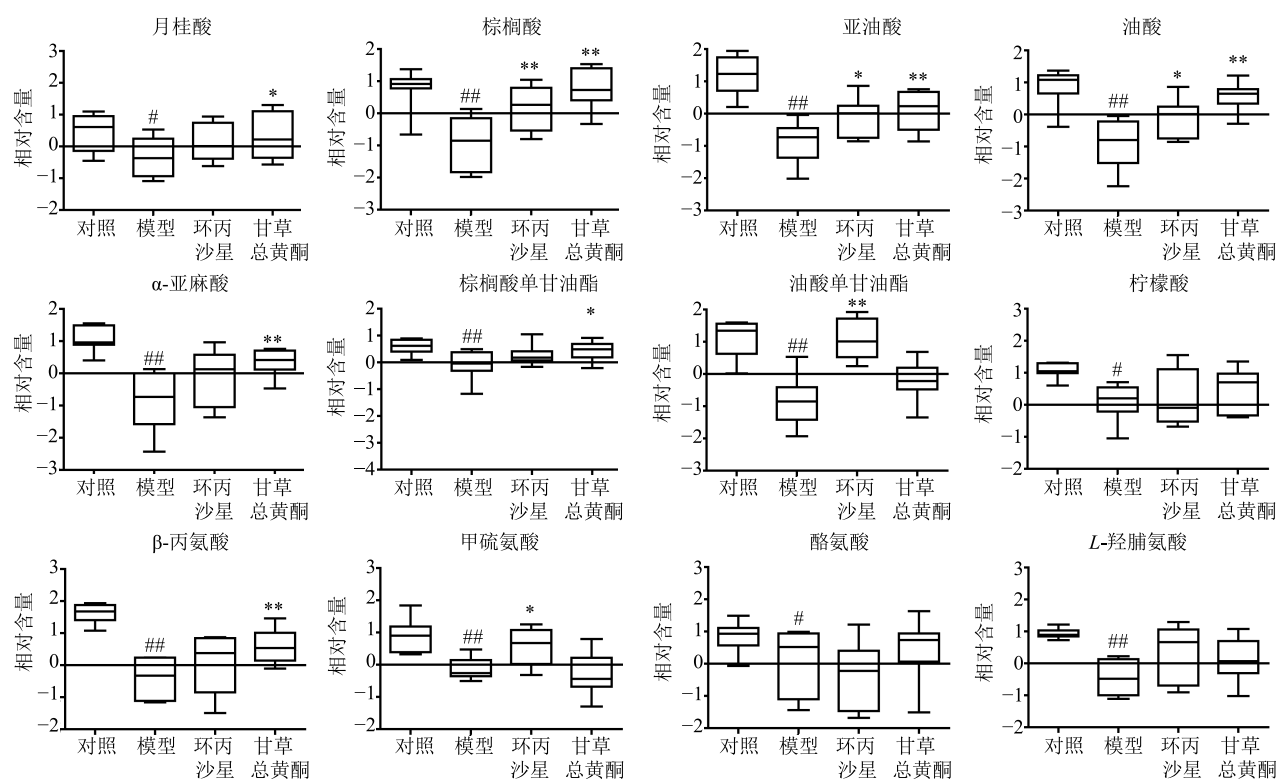


图 3 甘草总黄酮对模型小鼠差异性代谢物的影响

Fig. 3 Effect of glycyrrhiza flavonoids on differential metabolites in different group

3.5 代谢通路的构建与分析

将从模型小鼠中找到的 20 个差异性代谢物导入 MetaboAnalyst 数据库中构建肠炎模型相关代谢通路,总共发现 24 条代谢通路,主要相关的 13 条潜在代谢通路见图 4,按影响值(impact)从大到小依次为亚油酸的代谢, α -亚麻酸代谢, β -丙氨酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,乙醛酸

和羧酸盐代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,磷酸肌醇代谢,色氨酸代谢,酪氨酸代谢,半胱氨酸和甲硫氨酸代谢,淀粉和蔗糖代谢,三羧酸循环,精氨酸和脯氨酸代谢,其影响值分别为 1.00、1.00、0.50、0.44、0.26、0.19、0.18、0.14、0.11、0.09、0.07、0.05、0.04。

在鉴别的 13 条相关代谢通路中,最主要的 2

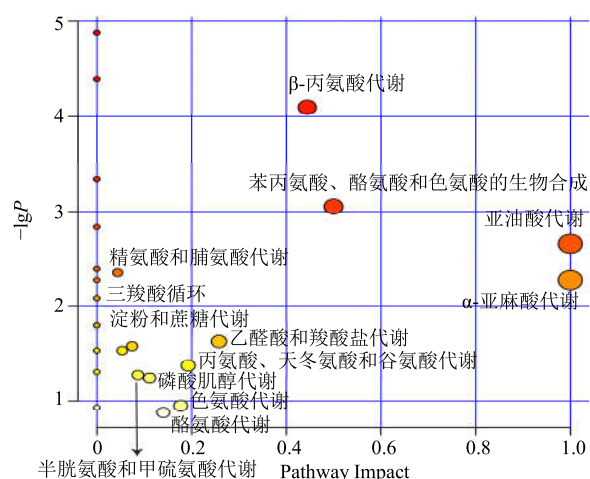


图4 肠炎模型小鼠血浆中 MetaboAnalyst 主要相关代谢通路
Fig. 4 Pathway analysis of experimental colitis mice by MetaboAnalyst

条代谢通路(影响因子大于 0.5)依次是亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢,它们分别为 n6、n3 系列的多不饱和脂肪酸(PUFA),已有文献表明 PUFA 在改善肠道屏障功能中起着重要作用^[15]。在生物氧化途径中,肠道微生物可将多不饱和脂肪酸转化产生羟基脂肪酸、氧化脂肪酸、共轭脂肪酸以及部分饱和脂肪酸,Miyamoto 等^[16]考察了亚油酸的初级代谢产物在肠道中的抗炎活性,发现共轭亚油酸可通过长链脂肪酸受体过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 的激活以起到抗炎作用;此外,亚油酸及 α -亚麻酸都为 G 蛋白偶联受体(GPR40)的内源性配体,可通过 GPR40 抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)的细胞表面受体 TNFR2 的表达,从而降低 TNF- α 的表达及其在结肠中的 mRNA 水平,改善肠屏障功能障碍^[16-17];此外有研究^[18]也证实亚油酸与结肠癌的发展程度有关,PUFA 和丁酸盐可通过增加 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 的表达协同治疗结肠细胞的凋亡。

4 讨论

本研究从体内层面证实了甘草总黄酮可降低伊立替康胃肠道毒性,同时采用代谢组学手段从内源性代谢的角度初步探讨了甘草总黄酮降低伊立替康胃肠道毒性的作用机制。结果表明,甘草总黄酮可改善伊立替康导致的小鼠体质量减轻、结肠长度缩短以及肠黏膜受损的现象。进一步基于 GC-MS 技术对血浆代谢组学结果进行分析,发现肠炎模型小鼠的内源性代谢物与正常小鼠得到了基本分离,模

型小鼠体内的长链脂肪酸、氨基酸等物质代谢异常。甘草总黄酮给药后,差异性代谢物中 7 种长链脂肪酸和 β -丙氨酸得到了显著地回调,改善了紊乱的代谢通路,从内源性代谢产物角度,再次验证了甘草总黄酮可降低伊立替康胃肠道毒性。结合药效研究以及各内源性代谢物的相对变化可发现,甘草总黄酮对紊乱代谢通路的逆转作用明显优于阳性药环丙沙星,可能与阳性药对菌群的影响有关,同时表明甘草总黄酮主要是通过调节亚油酸以及 α -亚麻酸代谢的相关异常代谢物而起到抗炎减毒作用。综上所述,甘草总黄酮具有减轻伊立替康的胃肠道毒性作用,其血浆代谢组学的研究为从内源性代谢物的角度探索甘草总黄酮的作用机制提供了依据。但目前关于脂肪酸与肠炎的研究多集中于短链脂肪酸,对长链脂肪酸研究较少,相关受体和肠炎发生之间的关系尚未明晰,各差异性代谢物与肠炎的内在联系以及相关代谢通路的验证仍需要进一步考察。

参考文献

- [1] Peterson D E, Bensadoun R J, Roila F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical practice guidelines [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(Suppl 6): i78-i84.
- [2] 覃一枫, 杭晓敏, 康安, 等. 伊立替康致“肠道菌群-肠-肝”轴代谢调控紊乱及中药防治研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 4114-4119.
- [3] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [4] Stein A, Voigt W, Jordan K. Chemotherapy-induced diarrhea: Pathophysiology, frequency and guideline-based management [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2010, 2(1): 51-63.
- [5] 李志华, 颜苗, 张毕奎, 等. 基于药动学的甘草配伍减毒机制研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(23): 3611-3616.
- [6] 杨晓露, 刘朵, 卞卡, 等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(1): 99-104.
- [7] 戴应和, 龙小琴, 张娟, 等. 甘草黄酮的抗炎作用及其机制研究进展 [J]. *江西中医药*, 2017, 34(2): 68-71.
- [8] 彭琳秀, 陈良慧, 狄留庆, 等. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术的复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 1964-1970.
- [9] 马君义, 张继, 王一峰, 等. 栽培乌拉尔甘草根中黄酮类和皂甙类化合物的提取与分析 [J]. *草业科学*, 2006, 23(5): 48-52.

- [10] 陈玉军, 王伟权, 张玉华, 等. 一种盐酸伊立替康注射液及其制备方法: 中国, CN102885765A [P]. 2013-01-23.
- [11] 段天璇. 甘草液相色谱指纹图谱及其应用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- [12] Zhong Z Y, Sun B B, Shu N, *et al.* Ciprofloxacin blocked enterohepatic circulation of diclofenac and alleviated NSAID-induced enteropathy in rats partly by inhibiting intestinal β -glucuronidase [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(7): 1002-1012.
- [13] Li Q, Zhang X, Wang W C, *et al.* CPT-11 activates NLRP3 inflammasome through JNK and NF- κ B signalings [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 289(2): 133-141.
- [14] 刘 鹏, 罗 利. 甘草与附子配伍后甘草黄酮含量变化的测定 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(10): 608-610.
- [15] 乔立君. 多不饱和脂肪酸对大鼠肠道菌群及脂肪代谢相关基因的影响 [D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [16] Miyamoto J, Mizukure T, Park S B, *et al.* A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 2902-2918.
- [17] Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, *et al.* Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31238.
- [18] Turk H F, Kolar S S, Fan Y Y, *et al.* Linoleic acid and butyrate synergize to increase Bcl-2 levels in colonocytes [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(1): 63-71.