

# 基于LC/IT-TOF-MS技术的雷公藤甲素干预溃疡性结肠炎的代谢组学研究

马光朝<sup>1</sup>, 章从恩<sup>2</sup>, 马致洁<sup>2</sup>, 吴昊<sup>2</sup>, 浦仕彪<sup>1\*</sup>

1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500

2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050

**摘要:** **目的** 通过代谢组学方法分析雷公藤甲素(TP)对溃疡性结肠炎(UC)小鼠内源性代谢物的影响,探讨TP干预UC的代谢途径和可能的机制。**方法** 将C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、TP组,采用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导UC小鼠模型。采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术检测小鼠血清样本,并结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对各组小鼠血清代谢差异进行表征,筛选出血清中潜在的差异代谢物及可能的代谢通路。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠血清中发现并鉴定出胆酸、牛黄胆酸、鹅去氧胆酸、瓜氨酸、肌酐、氨基乙酸、顺乌头酸等15个差异代谢物。与模型组比较,给予TP干预后,上述潜在差异代谢物有向正常水平回调的趋势。**结论** 代谢组学分析揭示TP对UC小鼠具有一定的干预作用,其机制可能与调节初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢等有关。

**关键词:** 雷公藤甲素; 溃疡性结肠炎; 血清; 差异代谢物; 代谢通路; 胆汁酸; 精氨酸; 脯氨酸

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)13-3493-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.017

## Study on intervention of triptolide on metabolism of LC/IT-TOF-MS in ulcerative colitis

MA Guang-chao<sup>1</sup>, ZHANG Cong-en<sup>2</sup>, MA Zhi-jie<sup>2</sup>, WU Hao<sup>2</sup>, PU Shi-biao<sup>1</sup>

1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

**Abstract: Objective** The effect of triptolide (TP) on endogenous metabolites in mice with ulcerative colitis (UC) was analyzed by means of metabolomics, and the metabolic pathway and possible mechanism of TP in UC were discussed. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into blank control group, model group, and triptolide group. Dextran sulfate (DSS) was used to induce UC mice model. The serum samples of mice were detected by high performance liquid chromatography-mass spectrometry and characterized by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to identify the potential biomarkers and possible metabolic pathways. **Results** Compared with the blank control group, a total of 15 potential biomarkers, such as cholic acid, bezoar cholic acid, goose-deoxycholic acid, citrulline, guanidine butyric acid, aminoacetic acid, and cis-aconitic acid, were found and identified in serum. Compared with the model group, the potential biomarkers showed a tendency of callback to normal level after TP intervention. **Conclusion** Metabolomics analysis reveals that TP had certain therapeutic effects on UC mice, and its mechanism may be related to regulating primary bile acid biosynthesis, arginine, and proline metabolism.

**Key words:** triptolide; ulcerative colitis; serum; differential metabolites; metabolic pathways; bile acid; arginine; proline

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是发生在结肠内的一种慢性复发性炎症性疾病。临床上主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便等,发病机制尚不清楚<sup>[1-2]</sup>。免疫紊乱、细胞因子失衡在UC中起着

重要作用,常用药物如皮质类固醇、氨基水杨酸盐只能暂时缓解症状,不能控制病情的进展,且不良反应明显。近年来,该病的发病率呈明显上升趋势,严重影响人民健康及生活质量<sup>[3-5]</sup>。

收稿日期: 2019-12-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760812); 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项资助[2017FF117(-035), 2018FF001(-021)]

作者简介: 马光朝, 硕士, 从事中药药理毒理研究。Tel: 18487301668 E-mail: maguang121@163.com

\*通信作者 浦仕彪, 副教授, 硕士生导师, 从事自身免疫性肝病的诊断与治疗。E-mail: pushi511@126.com

雷公藤甲素 (triptolide, TP) 是从雷公藤中分离得到的二萜类环氧化物, 具有抗炎和免疫抑制作用, 广泛应用于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、肾炎和银屑病等自身免疫性和炎症性疾病。研究表明 TP 能有效改善 UC 小鼠肠黏膜炎症并具有较好的干预作用<sup>[6-8]</sup>, 但其潜在的作用机制尚未阐明。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 为研究疾病的发病机制提供了新的方向。该方法用于低相对分子质量代谢物的鉴定和定量, 并生成反映生物系统状态的代谢物谱图<sup>[9-10]</sup>。代谢组学已广泛应用于药物作用机制的研究, 为寻找疾病相关代谢差异物提供了重要的技术支持<sup>[11-12]</sup>。本研究利用代谢组学的研究方法, 分析 TP 对 UC 小鼠内源性代谢物的影响, 进一步探讨 TP 干预 UC 的代谢途径和可能机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 (8 周龄, 雄性, 体质量 18~22 g) 30 只, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK(京)-2016-0002, 小鼠分笼饲养于首都医科大学附属北京友谊医院实验动物中心。

### 1.2 药材与试剂

TP (中国食品药品检定研究院, 批号 111567-201404, 质量分数 99.8%); 右旋葡聚糖硫酸钠 (DSS, 批号 31404, MP 公司); 小鼠白细胞介素-6 (IL-6)、小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司); 乙腈 (色谱级, Merck 公司); 纯净水 (杭州娃哈哈公司)。

### 1.3 仪器

LC-MS/MS-IT-TOF 仪 (日本岛津公司); Waters XBridge<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5  $\mu$ m); AL204 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); Gradient A10 Mill-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司); XW-80C 涡旋混合器 (上海医科大学仪器厂); 冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); 酶标仪 (Thermo Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为对照组、模型组、TP 组, 每组 10 只。取适量 TP 于生理盐水充分溶解, 临用前制成相应质量浓度。对照组与模型组 ig 给予生理盐水, TP 组 ig 给予 TP 0.4 mg/kg<sup>[13-14]</sup>,

给药 3 d 后, 除对照组外, 其余 2 组小鼠自由饮用 2.5% 的 DSS 溶液 7 d, 实验周期 10 d。正常饮水饮食, 每天观察小鼠活动状态, 记录体质量, 摄食量等。

### 2.2 动物取材及处理

于实验第 10 天, 所有小鼠眼眶静脉取血, 冷冻离心 (4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min、10 min), 取上清, 分装, -80  $^{\circ}$ C 保存。ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- $\alpha$  水平。

取结肠组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 行石蜡切片后进行 HE 染色, 在光学显微镜下对结肠组织进行病理观察并采集图像。

### 2.3 HPLC-MS 检测

采用 Waters XBridge<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5  $\mu$ m); 柱温为 40  $^{\circ}$ C, 体积流量为 0.35 mL/min, 进样量为 5  $\mu$ L, 样品温度为 4  $^{\circ}$ C; 流动相洗脱条件: 流动相 A 为 H<sub>2</sub>O, 流动相 B 为乙腈。具体洗脱条件见表 1。

质谱参数设置: 采用 ESI<sup>±</sup> 电离模式; 扫描范围  $m/z$  100~1 000; 离子源电压 4 kV; 锥孔电压 50 V; 雾化器气流量 11 L/min; 干燥器压力 1 000 kPa; 洗脱剂温度 350  $^{\circ}$ C; 诱导碰撞解离能量 (CID energy) 50%; 检测器电压 1.80~2.10 kV。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution condition of mobile phase

| $t/\text{min}$ | A/% | B/% |
|----------------|-----|-----|
| 0.01           | 95  | 5   |
| 3              | 95  | 5   |
| 5              | 50  | 50  |
| 7              | 50  | 50  |
| 10             | 25  | 75  |
| 20             | 25  | 75  |
| 27             | 5   | 95  |
| 30             | 5   | 95  |
| 35             | 95  | 5   |
| 42             | 95  | 5   |

### 2.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 各项指标结果以  $\bar{x} \pm s$  描述, 各组间比较采用单因素方差分析, 两样本比较, 方差齐性者采用 LSD 法检验, 方差不齐者采用 Dunnett's 法检验。

采用 Profiling solution 软件进行数据转化和色谱峰识别, 然后导入 SIMCA 14.1 软件, 标准化后进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判

别分析 (OPLS-DA)。根据  $VIP > 1.0$ 、相关系数 ( $|p(\text{corr})|$ )  $\geq 0.58$  筛选潜在的差异代谢物, 再采用 One-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) 排除没有显著性差异的化合物。最后通过数据库确定差异代谢物, 再使用 MetaboAnalyst 4.0 进行代谢通路分析。

### 3 结果

#### 3.1 TP 对 UC 小鼠结肠组织病理学及血清炎症因子水平的影响

结肠组织病理切片 (HE 染色) 结果显示 (图 1-A), 对照组小鼠结肠大体正常, 黏膜层未见炎症

细胞浸润。模型组小鼠肠黏膜充血水肿、糜烂, 可见溃疡, 黏膜组织可见大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 隐窝消失, 上皮细胞坏死脱落。TP 组小鼠结肠黏膜上皮细胞排列整齐, 炎症细胞浸润减少, 结肠炎症得到改善。炎症因子检测结果显示 (图 1-B、C), 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, TP 组小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  显著降低 ( $P < 0.01$ )。提示 TP 可抑制 UC 小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达。

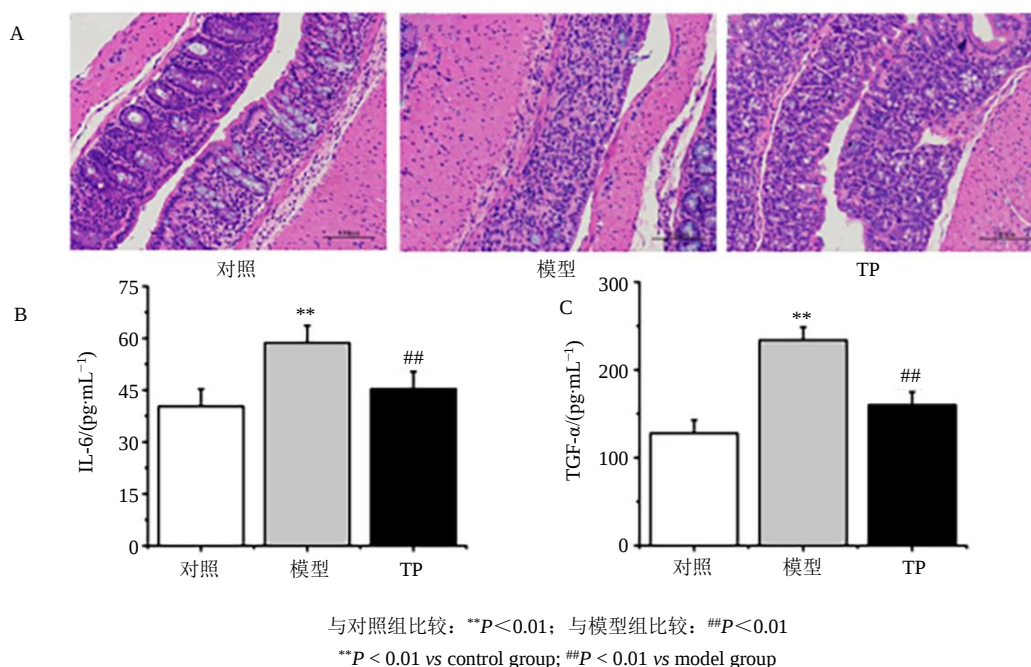


图 1 TP 对 UC 小鼠结肠组织病理学 (A) 及血清炎症因子水平 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effects of TP on colon histopathology (A) and serum levels of inflammatory factors (B) in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

#### 3.2 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。如图 2 所示, 对照组、模型组与 TP 组分别处于不同象限内, 呈现明显的聚类特征, 表明 3 组小鼠在代谢物水平上具有一定的差异性。对照组与模型组分离度良好。与模型组比较, TP 组小鼠体内小分子代谢物发生了显著改变且显示出恢复正常水平的趋势。采用 MetaboAnalyst 4.0 软件进行聚类分析, 通过热图的聚类结果分析组间差异, 绿色带表示代谢物水平降低, 红色带表示代谢物水平升高。如图 3 所示, 代谢物的相对丰度在不同组间存在显著差异。给予 TP 治疗显著调控了潜在差异代谢物的趋势, 逆转了 DSS 对这些差异代谢物的影响。结果表明,

通过 TP 处理, UC 小鼠体内代谢物的变化趋势部分恢复正常。

#### 3.3 OPLS-DA

OPLS-DA 可以从检测到的若干变量值中寻找潜在的差异代谢物。如图 4-A、B 所示, 模型组

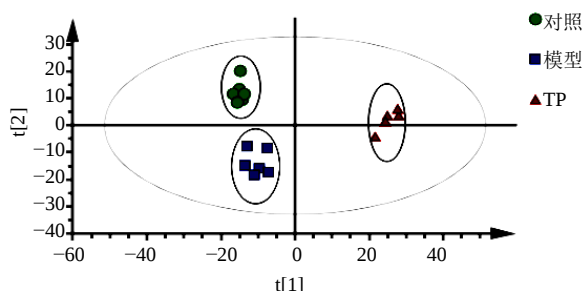
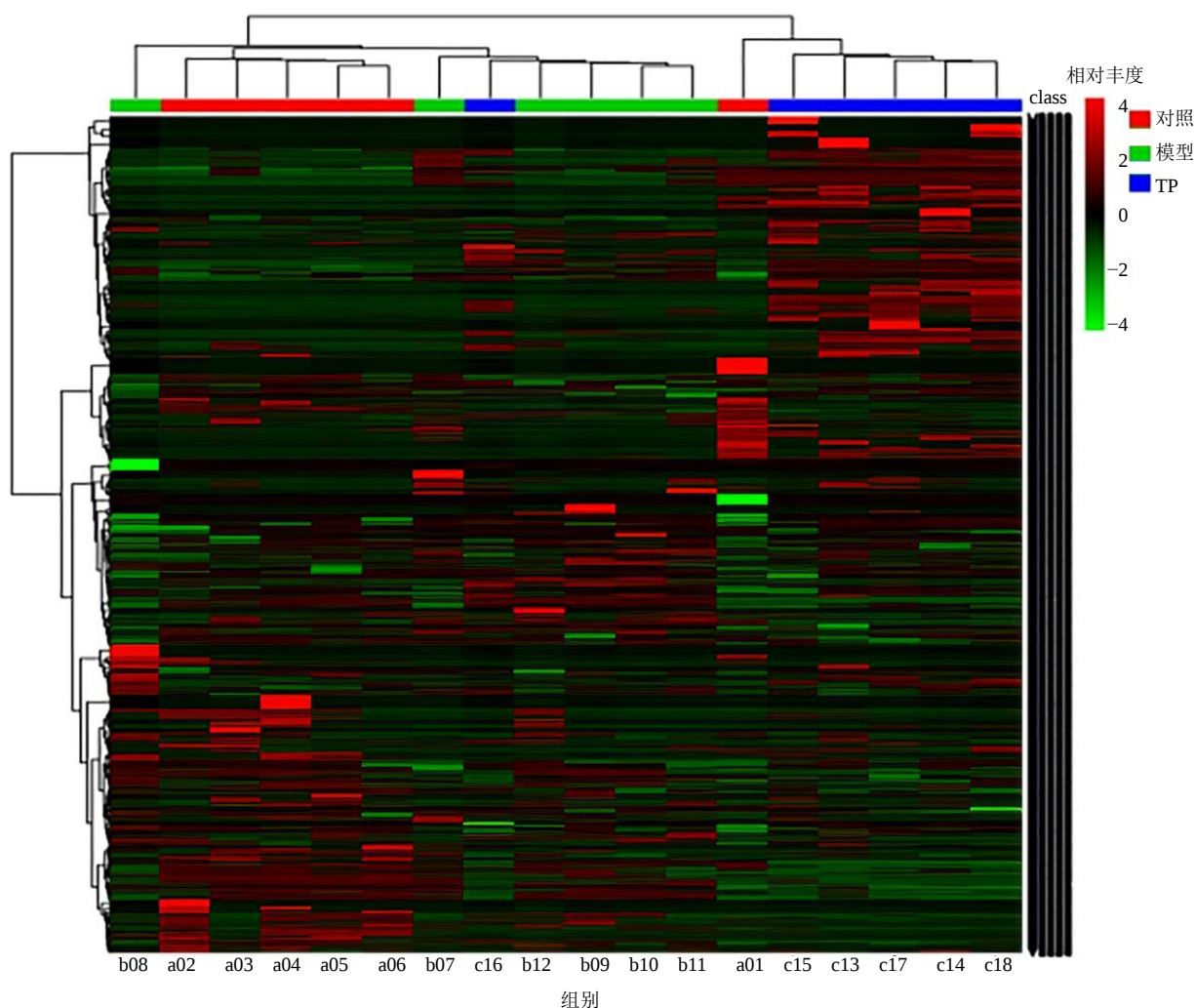


图 2 小鼠血清代谢物 PCA

Fig. 2 PCA analysis of mouse serum



a01~06 为对照组, b07~12 为模型组, c13~18 为 TP 组; 绿色表示下调, 红色表示上调  
a01—06 are samples of control group, b07—12 are samples of model group, c13—18 are samples of TP group; Green suggests down-regulation and red suggest up-regulation

图 3 基于不同组代谢物的热图

Fig. 3 Heatmap visualization based on difference metabolites in different groups

小鼠血清代谢物与对照组存在明显的差异, TP 组小鼠血清代谢物与模型组存在明显的差异。再通过 VIP (variable importance in the projection) 和载荷权重 (loading weight) 多维统计分析来筛选代谢物差异性变量。如图 4-C、D 所示, 每个小分子距离中心坐标轴越远, 说明该物质对分组贡献越大, 所代表的代谢物差异也就越大, 即可作为潜在的差异代谢物。

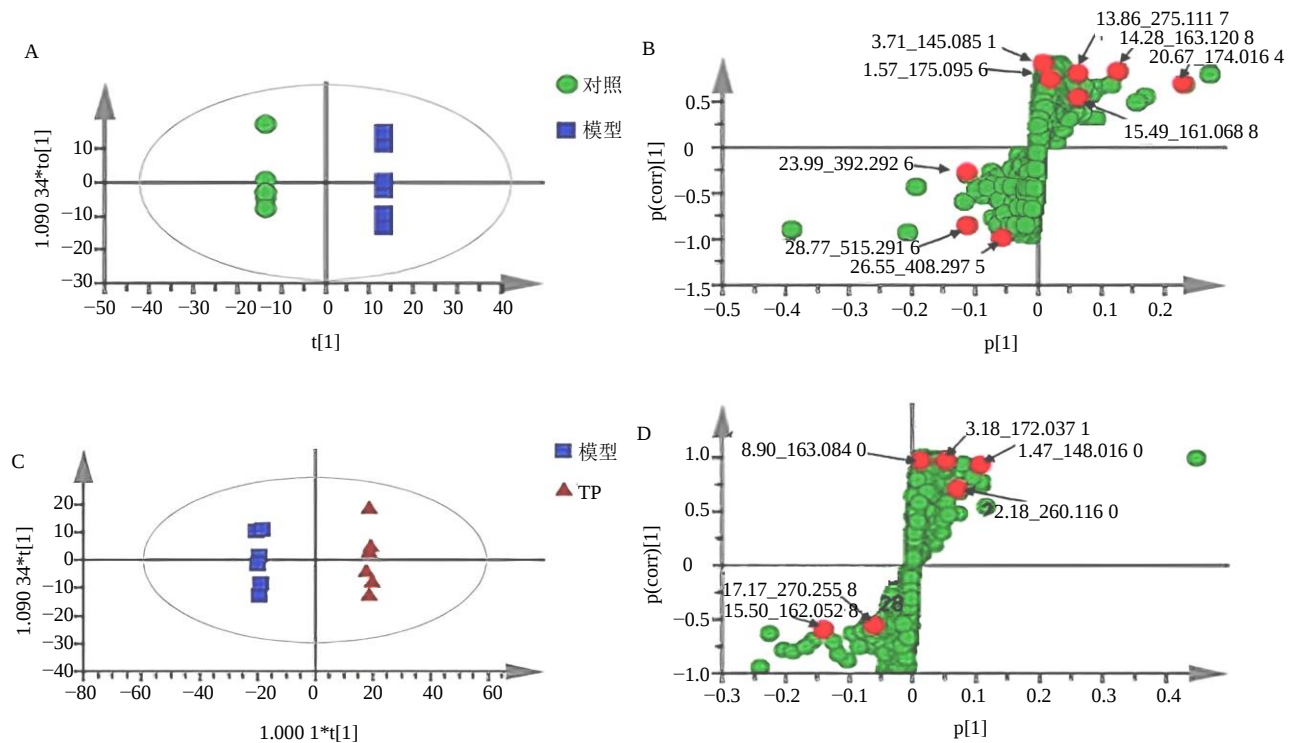
### 3.4 差异代谢物的筛选

为探寻与溃疡性结肠炎有关的差异代谢物, 采用 OPLS-DA, 根据  $VIP \geq 1$ ,  $|P(\text{corr})| \geq 0.58$  及  $\text{fold change} > 1.5$ ,  $P < 0.05$  的筛选条件筛选出潜在的差异代谢物, 通过 Metlin、KEGG 及 HMDB 数据库对

筛查到的具有显著性差异的代谢物进行分析识别, 共鉴定出 15 个差异代谢物, 见表 2、3。其中包括代谢物种类及对应的分子式、相对分子质量、保留时间、VIP 值等信息。所鉴定出的代谢物涉及到胆酸、牛黄胆酸、鹅去氧胆酸、瓜氨酸、胍基丁酸、氨基乙酸、顺乌头酸、乙酰胆碱等代谢物质。从筛选出的代谢物变化趋势可以看出, 在 TP 作用的过程中, 小鼠体内小分子代谢物水平也在不断地改变。

### 3.5 差异代谢物通路分析

将筛选出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 4.0 进行通路分析。结果如表 4 所示, 这些代谢物与 8 条代谢通路密切相关, 分别是初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸生物合成、牛磺酸与



A、B-对照和模型组的 OPLS-DA 得分图和 S-plot 图；C、D-模型组和 TP 组的 OPLS-DA 得分图 S-plot 图  
A, B-score chart and S-plot of OPLS-DA analysis of control group and model group; C, D-score chart and S-plot of OPLS-DA analysis of model group and triptolide group

图 4 小鼠血清 OPLS-DA 结果

Fig. 4 Schematic diagram of results of OPLS-DA analysis of mouse serum

表 2 差异代谢物的筛选

Table 2 Screening of differential metabolites

| 代谢物                                                     | 模型 vs 对照 |       |        | TP vs 模型 |       |        |
|---------------------------------------------------------|----------|-------|--------|----------|-------|--------|
|                                                         | VIP      | fold  | $P^a$  | VIP      | fold  | $P^a$  |
| 邻苯二甲酸酐 (phthalic anhydride)                             | 3.04     | 2.17  | 0.003  | 1.07     | 6.69  | <0.001 |
| 瓜氨酸 (citrulline)                                        | 3.19     | 2.38  | 0.004  | 1.71     | 11.12 | <0.001 |
| cyclo (-Pro-Tyr-)                                       | 1.51     | 11.65 | <0.001 | 1.19     | 3.37  | 0.002  |
| 去氢莽草酸 (dehydroshikimic acid)                            | 1.10     | 4.45  | 0.001  | 1.34     | 4.77  | 0.001  |
| $\gamma$ -胍丁酸 ( $\gamma$ -guanidinobutyric acid)        | 1.15     | 33.38 | <0.001 | 3.62     | 0.54  | 0.001  |
| 3-氨基-2-羟基戊酸 (3-amino-2-hydroxy pentandioic acid)        | 2.45     | 5.48  | 0.026  | 2.73     | 0.52  | 0.001  |
| $\gamma$ -L-谷酰基-谷氨酰胺 ( $\gamma$ -L-glutamyl- glutamine) | 2.18     | 0.07  | 0.023  | 1.12     | 0.72  | 0.004  |
| 乙酰胆碱 (acetylcholine)                                    | 1.24     | 6.53  | 0.035  | 3.45     | 8.49  | 0.003  |
| $\alpha$ -氨基己二酸 ( $\alpha$ -aminoadipic acid)           | 1.32     | 0.20  | 0.029  | 2.14     | 3.37  | <0.001 |
| 3,6-脱水半乳糖 (3,6-anhydrogalactose)                        | 1.91     | 0.12  | <0.001 | 1.97     | 26.52 | 0.001  |
| 十七酸 (daturic acid)                                      | 1.51     | 0.80  | <0.001 | 1.34     | 7.21  | <0.001 |
| 顺式乌头酸 (cis-aconitic acid)                               | 2.03     | 0.85  | <0.001 | 2.90     | 4.14  | <0.001 |
| 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)                           | 1.08     | 0.92  | <0.001 | 1.38     | 5.20  | 0.037  |
| 胆酸 (cholic acid)                                        | 1.79     | 0.45  | 0.002  | 1.23     | 0.94  | 0.001  |
| 牛磺胆酸 (taurocholic acid)                                 | 1.59     | 3.34  | 0.001  | 2.37     | 1.08  | 0.003  |

<sup>a</sup> 显著性差异来自  $t$  检验

<sup>a</sup>The significant differences were generated from the Student's  $t$ -test

表 3 基于 HPLC-MS 的潜在差异代谢物鉴定

Table 3 Identification of potential metabolites based on HPLC-MS

| $t_R/\text{min}$ | 化合物                  | 相对分子质量    | 误差/ $(\times 10^{-6})$ | 分子式                                              | 质谱碎片离子                                                                                                                                      |
|------------------|----------------------|-----------|------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.47             | 邻苯二甲酸酐               | 148.016 0 | 7.18                   | $\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_3$                 | 148 $[\text{M}+\text{H}]^+$                                                                                                                 |
| 1.57             | 瓜氨酸                  | 175.095 6 | 4.37                   | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$    | 175 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 157 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 139 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$              |
| 2.18             | cyclo (-Pro-Tyr-)    | 260.116 0 | 1.38                   | $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ | 260 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 231 $[\text{M}+\text{H}-\text{CHO}]^+$ , 214 $[\text{M}+\text{H}-\text{CHO}-\text{OH}]^+$                     |
| 3.18             | 去氢莽草酸                | 172.037 1 | 4.68                   | $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_5$                 | 172 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 128 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$                                                                       |
| 3.71             | $\gamma$ -脯氨酸        | 145.085 1 | -3.23                  | $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$    | 145 $[\text{M}-\text{H}]^-$                                                                                                                 |
| 8.90             | 3-氨基-2-羟基戊酸          | 163.048 0 | -5.96                  | $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_5$                | 163 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 127 $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^-$                                                               |
| 13.86            | $\gamma$ -L-谷酰基-谷氨酰胺 | 275.111 7 | 2.24                   | $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6$ | 275 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 257 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 247 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$                        |
| 14.28            | 乙酰胆碱                 | 163.120 8 | -5.96                  | $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{NO}_3$             | 163 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 145 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$                                                                |
| 15.49            | $\alpha$ -氨基己二酸      | 161.068 8 | 3.12                   | $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$             | 161 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 125 $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^-$                                                               |
| 15.50            | 3,6-脱水半乳糖            | 162.052 8 | -6.18                  | $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$              | 163 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 145 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$                                                                |
| 17.17            | 十七酸                  | 270.255 8 | -1.18                  | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$           | 270 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 234 $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^-$ , 190 $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$ |
| 20.67            | 顺式乌头酸                | 174.016 4 | -4.41                  | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$                 | 174 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 130 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$                                                                       |
| 23.99            | 鹅去氧胆酸                | 392.292 6 | 4.17                   | $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$           | 392 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 364 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^-$ , 336 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{CO}]^-$ |
| 26.55            | 胆酸                   | 408.287 5 | -1.12                  | $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$           | 408 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 376 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^-$ , 348 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{CO}]^-$ |
| 28.77            | 牛磺胆酸                 | 515.291 6 | -2.23                  | $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{S}$  | 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 500 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ , 472 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}]^-$                   |

表 4 相关代谢途径分析的主要信息

Table 4 Main information of related metabolic pathway analysis

| 通路                                                  | 匹配代谢物总数 | hits | raw $P$ | $-\lg P$ | FDR  | impact |
|-----------------------------------------------------|---------|------|---------|----------|------|--------|
| 初级胆汁酸生物合成 (primary bile acid biosynthesis)          | 46      | 3    | 0.001 6 | 6.437 1  | 0.13 | 0.03   |
| 精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)         | 44      | 2    | 0.023 4 | 3.753 6  | 0.64 | 0.03   |
| 赖氨酸生物合成 (lysine biosynthesis)                       | 4       | 1    | 0.022 4 | 3.798 0  | 0.64 | 0      |
| 牛磺酸和次牛磺酸代谢 (taurine and hypotaurine metabolism)     | 8       | 1    | 0.044 4 | 3.114 7  | 0.91 | 0      |
| 乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism) | 18      | 1    | 0.097 4 | 2.328 4  | 1.00 | 0.03   |
| 柠檬酸循环 [citrate cycle (TCA cycle)]                   | 20      | 1    | 0.107 7 | 2.228 0  | 1.00 | 0.03   |
| 赖氨酸降解 (lysine degradation)                          | 23      | 1    | 0.123 0 | 2.095 6  | 1.00 | 0      |
| 甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)             | 30      | 1    | 0.157 7 | 1.847 1  | 1.00 | 0      |

次牛磺酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、柠檬酸循环、赖氨酸降解、甘油磷脂代谢。其中，初级胆汁酸生物合成与代谢物相关性最强，其次，精氨酸和脯氨酸代谢也对生物代谢具有稍弱影响。表明这 2 条代

谢通路可能与 UC 有关。为了更直观清晰了解 UC 小鼠体内代谢路径，构建了差异代谢物体内代谢通路图，见图 5。经 TP 干预后代谢物趋势发生改变，代谢通路得到了相应的调节。

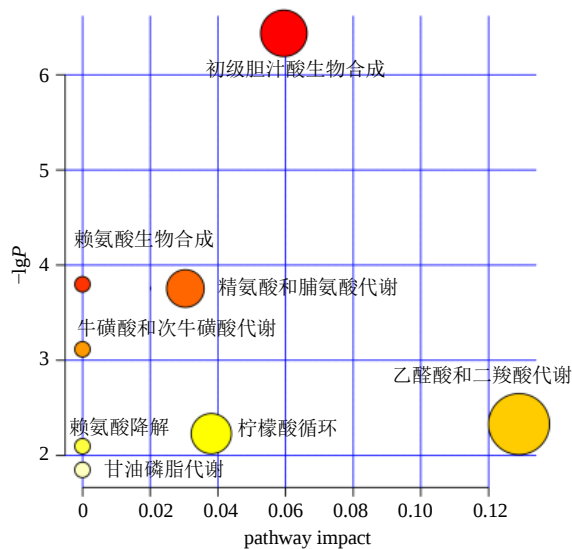


图 5 代谢通路分析

Fig. 5 Metabolic pathway analysis results

#### 4 讨论

本研究评价了 TP 对 UC 小鼠模型的药效，血清炎症因子结果表明本研究成功复制出 UC 小鼠模型并且 TP 对 UC 有一定的干预作用。研究发现 TP 干预 UC 存在剂量依赖性，与模型组比较，TP 干预组小鼠的饮食与体质量均有所改善<sup>[15-16]</sup>。采用代谢组学分析方法探讨 TP 干预 UC 可能的作用机制，发现其可能与调节初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸等代谢通路有关。

TP 是从雷公藤中分离出来的单体，是雷公藤的主要有效成分。研究显示，在自身免疫性疾病的治疗上具有独特优势。对相关药效学指标进行分析，发现 TP 有效改善 UC 小鼠肠黏膜炎症。代谢组学分析结果显示，对照组、模型组、TP 组分布在不同象限区域内，分离度好，表明各组小鼠体内的小分子代谢物水平存在一定的差异性。当小鼠经 DSS 诱导后，体内小分子代谢物水平与对照组相比出现了显著性的变化，而给予 TP 后，这些异常变化的小分子代谢物又表现出恢复正常水平的趋势。研究结果显示，胆酸、牛黄胆酸、鹅去氧胆酸、瓜氨酸、肌基丁酸、氨基乙酸、顺乌头酸等 15 个代谢物可作为与 UC 相关的潜在生物标志物。

胆汁酸代谢紊乱在肠道炎症中起着重要作用<sup>[17]</sup>。胆酸和去氧胆酸是由肝脏中的胆固醇合成的 2 种主要胆汁酸。合成后，肝细胞将胆汁酸转化为胆盐，与其他胆汁成分一起被排泄到小管中，由此产生的胆汁被运送到胆囊并储存在胆囊中。部分胆盐被肠

道细菌代谢产生次级胆汁酸和游离的初级胆汁酸，初级和次级胆汁酸在回肠末端和大肠内被重新吸收然后通过门静脉循环回到肝脏<sup>[18-19]</sup>。鹅去氧胆酸通过增加胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶的表达，进而释放硫化氢，从而对 UC 产生积极的作用<sup>[20]</sup>。这些胆汁酸水平在 UC 小鼠血清中明显增加，提示 UC 存在初级胆汁酸代谢障碍，给予 TP 干预后出现不同程度的回调。

甘油磷脂是细胞膜的主要成分，在哺乳动物细胞中具有重要的结构和功能作用<sup>[21]</sup>，在信号转导和许多其他生物相关分子的前体中也起着重要的作用。甘油磷脂水平的变化表明细胞膜成分和通透性发生了变化。因此，甘油磷脂水平的变化将反映脂质代谢紊乱，是一个重要的生物学指标<sup>[20]</sup>。研究显示，UC 小鼠出现脂质代谢紊乱及相关炎症因子的变化。分析 TP 可能对甘油磷脂代谢通路进行调节，从而改善 UC 症状。

瓜氨酸是一种非蛋白氨基酸，主要由肠细胞以谷氨酰胺为原料合成<sup>[23]</sup>。瓜氨酸作为小肠细胞产生的中间代谢氨基酸，参与尿素循环，参与精氨酸和一氧化氮 (NO) 的合成。精氨酸在包括尿素循环、多聚氨基酸和肌酸合成、免疫功能调节和 NO 合成在内的正常和疾病状态下在各种代谢过程中起关键作用。因此，血浆瓜氨酸水平被认为是诊断吸收性肠细胞团块和胃肠道并发症的一种有前景的定量生物标志物<sup>[24]</sup>。本研究发现，UC 小鼠瓜氨酸水平显著高于对照组，其水平的变化与体内精氨酸和脯氨酸代谢有关。

综上所述，本研究应用代谢组学方法对 UC 小鼠内源性代谢产物与对照组、TP 组小鼠内源性代谢物之间的差异进行研究。UC 致使小鼠体内一系列代谢途径发生紊乱，而给予 TP 干预后紊乱的代谢通路得到有效调节，表明 TP 对 UC 具有一定的干预作用，其机制可能与 TP 调节小鼠体内紊乱的初级胆汁酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢等有关。

#### 参考文献

- [1] Gou S Q, Huang Y M, Wan Y, et al. Multi-bioresponsive silk fibroin-based nanoparticles with on-demand cytoplasmic drug release capacity for CD44-targeted alleviation of ulcerative colitis [J]. *Biomaterials*, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.05.012.
- [2] He W, Liu M Y, Li Y M, et al. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer integrity [J]. *Euro*

- J Pharm*, 2019, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172456.
- [3] Shao S, Wang D D, Zheng W, *et al.* A unique polysaccharide from *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis rats by modulating the composition of the gut microbiota, short chain fatty acids levels and GPR41/43 respectors [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.02.038.
- [4] Shen J, Cheng J Z, Zhu S J, *et al.* Regulating effect of baicalin on IKK/IKB/NF- $\kappa$ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.052.
- [5] Zhu L, Gu P Q, Shen H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.036.
- [6] Wei X W, Gong J F, Zhu J, *et al.* Therapeutic effects of triptolide on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2008, 8(13/14): 1808-1812.
- [7] Zhu J Y, Wang H H, Chen F, *et al.* Triptolide enhances chemotherapeutic efficacy of antitumor drugs in non-small-cell lung cancer cells by inhibiting Nrf2-ARE activity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.taap.2018.09.004.
- [8] 吴昊, 于小红, 王焕, 等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2020, 51(2): 387-396.
- [9] Li X Z, Zhang S N, Yang X Y. Serum-based metabolomics characterization of patients with reticular oral lichen planus [J]. *Archiv Oral Biol*, 2019, doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.019.
- [10] Zhang P X, Zhang W G L, Lang Y, *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics for tuberculosis meningitis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, doi: 10.1016/j.cca.2018.04.022.
- [11] Matich E, Soria N C, Aga D S, *et al.* Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants [J]. *J Hazard Mater*, 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.02.084.
- [12] 姬海南, 王朋倩, 吴茵, 基于UHPLC-MS的吴茱萸汤影响虚寒呕吐大鼠尿液代谢谱的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(18): 4352-4363.
- [13] 尹亮, 王亮, 蒋维维, 等. 雷公藤甲素对人肝癌细胞株HepG2体内外作用的研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(2): 170-174.
- [14] Wei D M, Liao Y P, Wang L, *et al.* Triptolide for cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2007, doi: 10.1016/S1673-5374(07)60035-8.
- [15] Zhang H F, Chen W C. Interleukin 6 inhibition by triptolide prevents inflammation in a mouse model of ulcerative colitis [J]. *Exper Ther Med*, 2017, 14(3): 2271-2276.
- [16] Zhang H F, Gong C, Qu L S, *et al.* Therapeutic effects of triptolide via the inhibition of IL-1 beta expression in a mouse model of ulcerative colitis [J]. *Exper Ther Med*, 2016, 12(3): 1279-1286.
- [17] Wong B S, Camilleri M, Carlson P, *et al.* Increased bile acid biosynthesis is associated with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(9): 1009-1015.
- [18] Vaz F M, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis [J]. *Mol Aspect Med*, 2017, doi: 10.1016/j.mam.2017.03.003.
- [19] Xiao Y, Yan W H, Zhou K J, *et al.* Glucocorticoid treatment alters systemic bile acid homeostasis by regulating the biosynthesis and transport of bile salts [J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(7): 771-779.
- [20] Goyal N, Rana A, Bijjem K R V, *et al.* Effect of chenodeoxycholic acid and sodium hydrogen sulfide in dinitro benzene sulfonic acid (DNBS)-induced ulcerative colitis in rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(3): 616-623.
- [21] Wang X L, Xu Y Y, Song X, *et al.* Analysis of glycerophospholipid metabolism after exposure to PCB153 in PC12 cells through targeted lipidomics by UHPLC-MS/MS [J]. *Ecotoxicol Envir Safety*, 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.006.
- [22] Uhl O, Glaser C, Demmelmaier H, *et al.* Reversed phase LC/MS/MS method for targeted quantification of glycerophospholipid molecular species in plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(30): 3556-3564.
- [23] Saitoh W, Takada S, Hirao J, *et al.* Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2018, doi: 10.1016/j.toxlet.2018.07.009.
- [24] Shin S, Jeong H M, Chung S E, *et al.* Simultaneous analysis of acetylcarnitine, proline, hydroxyproline, citrulline, and arginine as potential plasma biomarkers to evaluate NSAIDs-induced gastric injury by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.051.