

• 药理与临床 •

基于血清生物标志物变化的蒙古扁桃石油醚提取物防治肝纤维化疾病进展动态研究

常虹¹, 白万富¹, 李倩¹, 刘全礼^{1,2}, 孟洪宇^{3*}, 石松利^{1,2*}

1. 内蒙古科技大学包头医学院药学院, 内蒙古 包头 014060

2. 内蒙古科技大学包头医学院 蒙药药效药代安全性评价研究院士工作站, 内蒙古 包头 014060

3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700

摘要: **目的** 应用代谢组学技术, 探究蒙古扁桃石油醚提取物对肝纤维化病程中代谢轮廓及生物标志物的影响, 从代谢角度揭示其抗肝纤维化的作用机制。 **方法** 大鼠连续 8 周 sc 四氯化碳 (CCl₄) 建立肝纤维化模型, 同时 ig 蒙古扁桃石油醚提取物 (1.75、1.25、0.75 g/kg) 或水飞蓟素 (50 mg/kg)。采用超高效液相色谱与四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 联用技术, 分析各组大鼠给药后第 2、4、6、8 周血清代谢表达谱的动态变化, 比较不同时间的大鼠血清潜在生物标志物含量变化, 依据代谢通路分析构建药物-靶点-通路网络图。 **结果** 蒙古扁桃石油醚提取物可纠正 CCl₄ 诱导的肝纤维化疾病发展各阶段代谢谱, 实验第 2 周时未见其对肝纤维化早期关键生物标志物产生回调; 中期 (第 4 周) 主要通过作用于胆固醇和鞘磷脂, 减轻肝损伤, 延缓肝纤维化形成; 晚期 (第 8 周) 主要通过回调鞘氨醇、鞘磷脂、胆固醇等 8 个关键生物标志物水平, 参与鞘脂类、甘油磷脂代谢, 初级胆汁酸生物合成, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成与降解, 发挥抗纤维化作用; 蒙古扁桃石油醚提取物中剂量 (1.25 g/kg) 对代谢谱回调趋势更明显, 对差异代谢物及关键生物标志物回调数量较多, 抗肝纤维化效果更佳。 **结论** 基于 UPLC-MS 代谢组学技术从微观代谢角度揭示了蒙古扁桃石油醚提取物可通过多靶点影响肝纤维化代谢物水平及其相关代谢通路, 从而有效改善肝纤维化。

关键词: 代谢组学; 生物标志物; 肝纤维化; 蒙古扁桃; 石油醚提取物**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)01-0108-10**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.014Dynamic study on protective effects of *Amygdala mongolica* on hepatic fibrosis based on changes of serum biomarkersCHANG Hong¹, BAI Wan-fu¹, LI Qian¹, LIU Quan-li^{1,2}, MENG Hong-yu³, SHI Song-li^{1,2}

1. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China

2. Academician Work Station for Pharmacology, Pharmacokinetics and Safety Evaluation of Mongolian Medicine, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract: Objective Serum metabolomics were utilized to explore the effects of the petroleum ether extract of *Amygdala mongolica* on the metabolic profile and biomarkers in hepatic fibrosis progression, and to clarify its mechanisms of anti-HF from the perspective of metabolism. **Methods** Rats were sc carbon tetrachloride (CCl₄) for 8 weeks to establish liver fibrosis model, and ig petroleum ether extract of *A. mongolica* (1.75, 1.25, 0.75 g/kg) and silymarin (50 mg/kg). Serum metabolic profiling was performed by UPLC-Q-TOF/MS to explore the dynamic changes of metabolic spectrum in all experimental groups at weeks 2, 4, 6, and 8. The serum potential and dynamical biomarkers alteration in each group during different time points were compared. The drug-target-pathway

收稿日期: 2020-07-03**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81760782); 国家自然科学基金资助项目 (81641137); 内蒙古自然科学基金资助项目 (2017MS0813); 内蒙古自然科学基金资助项目 (2018LH03027); 内蒙古自治区“草原英才”工程青年创新创业一层次人才项目 (Q2017046); 包头医学院博士科研启动基金资助项目 (BSJJ201809); 北京中医药大学新教师启动基金资助项目 (2019-JYB-XJSJJ-023)**作者简介:** 常虹 (1985—), 博士, 讲师, 研究方向为中蒙药药理。Tel: (0472)7167795 E-mail: changhong_cool@163.com***通信作者:** 孟洪宇 (1988—), 女, 主治医师, 研究方向为中医内科疾病临床与基础研究。Tel: (010)84015829 E-mail: menghyhy@126.com
石松利 (1982—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中蒙药药理。Tel: (0472)7167795 E-mail: shisongli122@126.com

network was constructed by metabolic pathway analysis. **Results** The petroleum ether extract of *A. mongolica* restored the CCl₄-induced alteration of metabolic spectrum in all stages of hepatic fibrosis. However, there was no effect on the key biomarkers in the early stage of liver fibrosis at the week 2 after being treated with *A. mongolica*, while it could reduce liver injury and mitigate the development of liver fibrosis by regulating cholesterol and sphingomyelin in the middle stage (4 weeks). In the late stage (8 weeks), *A. mongolica* played an anti-fibrosis role by reversing eight key biomarkers including sphingosine, sphingomyelin and cholesterol, participating in sphingomyelin metabolism, glycerol phospholipid metabolism, primary bile acid biosynthesis; And participating in biosynthesis and degradation of valine, leucine, isoleucine. In addition, the petroleum ether extract of *A. mongolica* (1.25 g/kg) group had better efficacies due to more obvious tendency for the callback of metabolic spectrum, and more restored differential metabolites and key biomarkers. **Conclusion** UPLC-MS-based metabonomic analysis revealed that petroleum ether extract of *A. mongolica* can effectively improve hepatic fibrosis through multi-target effect on hepatic fibrosis metabolites and related metabolic pathways

Key words: metabonomics; biomarkers; hepatic fibrosis; *Amygdalus mongolica* (Maxim.) Ricker; petroleum ether extract

肝纤维化是炎症等刺激器官, 实质细胞发生坏死、组织内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增多和过度沉积的复杂动态可逆性病理过程^[1]。中药具有多环节、多途径、多靶点的作用特点, 在治疗脏器纤维化方面有独特优势。因此, 挖掘天然有效药物, 对治疗肝纤维化有重要意义。代谢组学技术在方法学上具有集融整性、动态、综合、分析于一体的特点, 与中医药整体观相吻合, 广泛应用于中医药疗效评价与机制研究^[2-4]。

蒙古扁桃 *Amygdalus mongolica* (Maxim.) Ricker 蒙名为乌兰-布衣勒斯, 是蒙古高原特有的阿拉善荒漠种, 属蔷薇科扁桃属旱生落叶灌木^[5]。蒙古扁桃作为民间传统药材, 其种仁代替中药“郁李仁”入药, 性平、味苦, 能润燥滑肠、止咳化痰、利尿, 主治咽喉干燥、干咳、支气管炎、阴虚便秘、水肿等症^[6-7]。课题组前期对蒙古扁桃化学成分和药理作用进行了基础研究, 从其种仁中分离发现不饱和脂肪酸、苦杏仁苷、有机酸、黄酮类、多糖类、生物碱类等多种成分^[8-13]。蒙古扁桃石油醚提取物作为其有效组分被证实具有良好的调血脂、抗脂质过氧化、改善肝肾纤维化作用^[14-16]。由于肝纤维化的发生发展为动态进展式病程, 因此研究疾病不同阶段的生物标志物动态变化对药物的药效评价及机制研究具有重要意义。目前尚缺乏蒙古扁桃石油醚提取物对肝纤维化发展的动态研究, 且其潜在作用机制不明。

课题组前期通过病理组织、氧化指标、血清肝纤维化四项对蒙古扁桃石油醚提取物进行了药效学评价, 并初步证实其具有抗肝纤维化作用^[15]。本研究在此基础上, 运用代谢组学技术, 探究其对肝纤维化模型大鼠不同阶段血清代谢谱、潜在生物标志物的种类和含量的影响, 进一步从代谢角度揭示蒙古扁桃提取物抗肝纤维化的作用机制, 为寻找抗肝

纤维化的有效药物提供科学依据, 也为蒙古扁桃药理作用的深入研究和中蒙药资源的开发提供理论基础和实验指导。

1 材料

1.1 药物

蒙古扁桃药材采自阿拉善雅布来戈壁, 经包头医学院药学院石松利教授鉴定为蔷薇科桃属扁桃亚属植物蒙古扁桃 *A. mongolica* (Maxim.) Ricker 的干燥成熟种子; 水飞蓟素胶囊 (批号 131102819, 规格 14 mg/粒) 购自德国马博士大药厂。

1.2 试剂

四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄, 批号 20091217) 购自天津市北方天医化学试剂厂; 特级初榨橄榄油 (批号 20150123) 购自山东鲁花集团有限公司; 羧甲基纤维素钠 (批号 20150912) 购自天津市凯通化学试剂有限公司; 乙腈 (色谱级) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 亮氨酸脑啡肽购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 纯净水购自美国 Sigma 公司; 甲酸 (色谱级) 购自美国 Dikma Technologies 公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 4 周龄, 体质量 170~200 g, 48 只, 购自北京大学医学部 (实验动物科学部), 许可证号 SCXK (京) 2011-0012。饲养条件: 实验室温度 23~25 °C, 相对湿度 (50±5) %。动物实验已获得内蒙古科技大学包头医学院医学伦理委员会批准 (批准号 20160310)。大鼠最终采取 sc 水合氯醛麻醉处死。

1.4 仪器

DZW-8-8 型水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); RE-52A 型旋转蒸发仪、SHZ-D (III) 循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); TGL-16M 型高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);

MH-250 型电热套 (北京科伟永兴仪器有限公司); Acquity™ UPLC 超高压液相色谱仪、四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF/MS, 美国 Waters 公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新有限公司)。

2 方法

2.1 蒙古扁桃石油醚提取物的制备

取蒙古扁桃种仁, 碾碎后用回流煎煮法以 95% 乙醇 90 °C 提取 2 次, 70% 乙醇 90 °C 提取 1 次, 每次 2 h, 回收溶剂浓缩成稠浸膏制备总提物, 再用石油醚进行萃取, 浓缩挥干称重, 得石油醚萃取物, 得率为 13.7%。经成分含量分析, 蒙古扁桃石油醚提取物主要含脂肪酸类化合物, 其中不饱和脂肪酸占总脂肪酸的 73.20%, 主要包括 28.87% 油酸、38.69% 亚油酸; 饱和脂肪酸以棕榈酸为主, 其质量分数为 19.66%^[14]。

2.2 肝纤维化模型制备、分组和给药

大鼠肝纤维化模型制备方法参照文献方法^[17], 依据石油醚提取物有效剂量, 大鼠适应 1 周后, 按体重随机分为对照组, 模型组, 水飞蓟素 (50 mg/kg, 水飞蓟素溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠配制质量浓度为 10 mg/mL 的溶液) 组, 蒙古扁桃高、中、低剂量 (1.75、1.25、0.75 g/kg, 蒙古扁桃石油醚提取物溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠分别配制质量浓度为 0.35、0.25、0.15 mg/mL 的溶液) 组, 每组 8 只^[14-15]。除对照组大鼠 sc 橄榄油外, 其余各组大鼠于腹部 sc 40% CCl₄ 橄榄油溶液 (首次 5 mL/kg, 之后 3 mL/kg), 2 次/周, 持续 8 周。造模同时各给药组大鼠 ig 相应药物 (5 mL/kg), 模型组和对照组 ig 等体积羧甲基纤维素钠溶液。

2.3 样本收集

大鼠分别于实验第 2、4、6、8 周眼眶静脉取血, 置于分离胶促凝管中, 离心取上清, 于 -80 °C 保存, 用于血清代谢组学研究。

2.4 血清代谢组学研究

2.4.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 2%~100% A; 15~17 min, 100% A; 17~18 min, 100%~2% A; 18~20 min, 2% A; 柱温为 40 °C; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 2 μL。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 采用正、负离子 W 模式检测, 毛细管电压为 1300 V (ESI⁺)、1500 V (ESI⁻); 样品锥孔电压为 60 V (ESI⁺)、70

(ESI⁻); 离子源温度为 110 °C; 脱溶剂温度为 350 °C; 脱溶剂氮气体积流量为 750 L/h; 锥孔气体积流量为 20 L/h。锁定质量溶液, 采用美国 Waters 公司 LockSpray™ 校正系统进行在线质量校正。亮氨酸脑啡肽准分子离子峰为 [M+H]⁺=556.277 1、[M-H]⁻=554.261 5, 锁定质量浓度为 1 ng/mL, 体积流量为 30 μL/min。扫描方式为全扫描, 质量扫描范围为 m/z: 100~1500。

2.4.3 多元数据分析 将各组血清样品测得的质谱数据导入 Waters Progenesis QI 2.3 软件进行分析。每个离子的强度相对于总离子数进行归一化, 并生成数据矩阵, 包括保留时间、质荷比、归一化后的峰面积。再使用 Waters EZinfo 3.0 软件, 采用无监督的主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 和有监督的偏最小二乘-判别分析法 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 对获得的多维复杂数据进行降维处理, 对各组大鼠血清的代谢物进行分析。课题组前期通过正交偏最小二乘-判别分析法 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 根据变量投射重要性 (VIP) >2 且 P<0.05 对对照组和模型组大鼠血清进行了差异代谢物的筛选; 并进行代谢通路分析 (metabolomics pathway analysis, MetPA), 根据 impact>0.02、-lgP>2 筛选出肝纤维化潜在的靶标路径, 根据这些路径中所对应的代谢物进一步筛选得到影响肝纤维化发生发展的关键潜在生物标志物^[17]。本研究使用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件对各组生物标志物动态研究进行统计学处理, 两组间比较采用 Student's t 检验, 多组采用单因素方差分析 (one-way-ANOVA)。

3 结果

3.1 蒙古扁桃石油醚提取物对肝纤维化不同发展阶段大鼠血清代谢轮廓的影响

采用 PCA 法对各组大鼠不同时间段血清代谢轮廓进行分析, 结果如图 1-A 所示, 各组样本聚类良好, 在肝疾病发展过程中, 模型组与对照组各时间点均呈不同聚类。为更好判别各给药组对代谢谱的影响, 采用有监督的 PLS-DA 分析对代谢谱进行最大限度分析, 结果如图 1-B 所示, 实验第 2 周时, 模型组与对照组之间分离良好, 说明肝纤维化疾病早期与正常大鼠之间有明显差异; 各给药组从第 2 周时开始与模型组聚类分离, 并向对照组移动; 第 8 周时, 各组聚类最为明显, 且回调趋势达到最大程度, 说明各给药组在肝纤维化发展过程中对内源

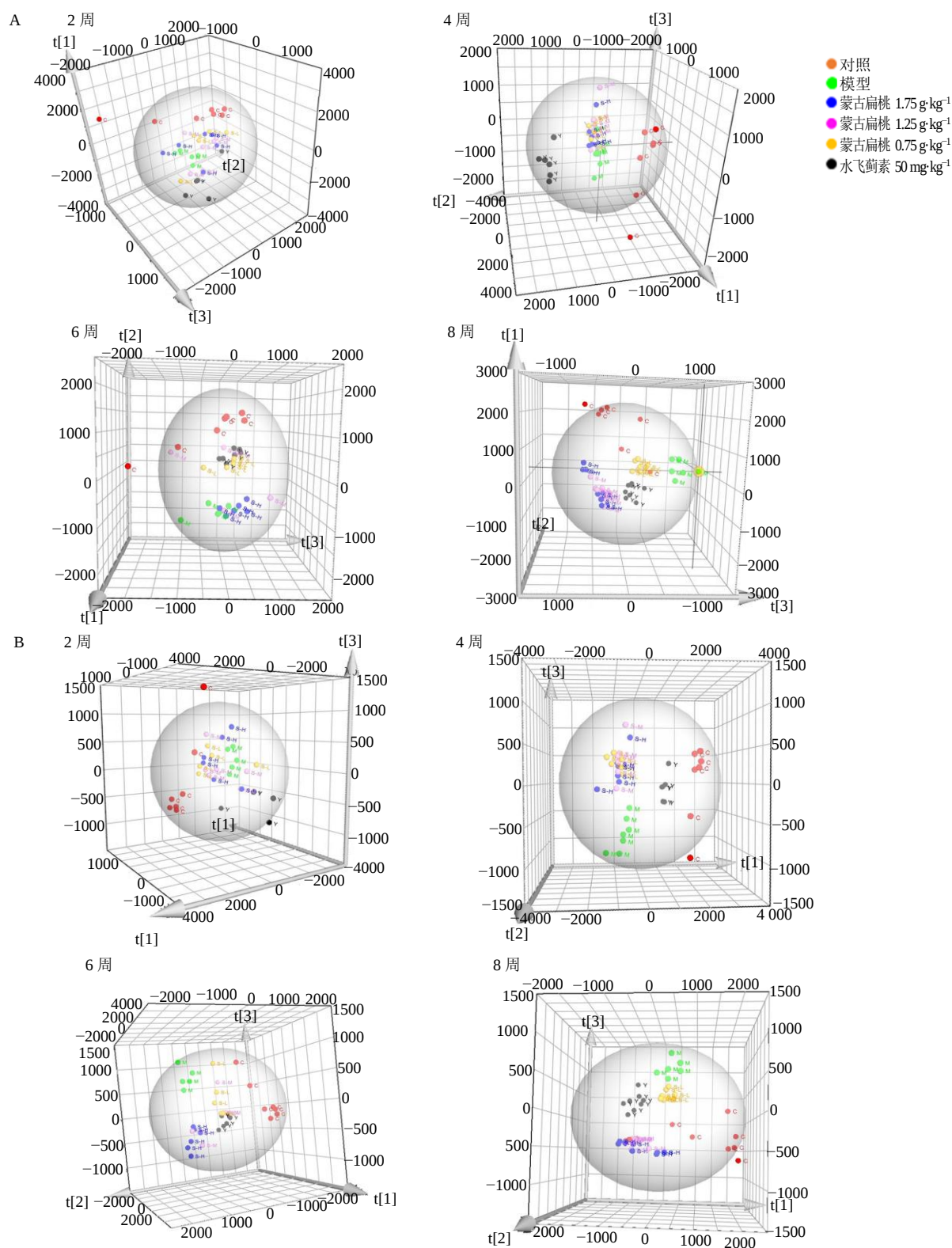


图 1 不同时间点各组血清样本正离子模式下的 PCA (A) 和 PLS-DA (B) 3D 模式得分图

Fig. 1 3D PCA (A) and PLS-DA (B) score plots of serum from different groups in positive ion mode at different time points

性代谢物产生正向调节作用,并能预防早期肝损伤。第 8 周时,蒙古扁桃高、中剂量组与模型组分分离程度较大,并与对照组有重合,说明高、中剂量蒙古扁桃

石油醚提取物抗肝纤维化作用优于低剂量蒙古扁桃石油醚提取物和水飞蓟素。肝纤维化病程各阶段模型所建立数学模型分别为第 2 周 ($R^2_Y=39\%$ 、 $Q^2=29\%$),

第 4 周 ($R^2_Y=58\%$ 、 $Q^2=54\%$), 第 6 周 ($R^2_Y=88\%$ 、 $Q^2=58\%$), 第 8 周 ($R^2_Y=97\%$ 、 $Q^2=85\%$)。结果表明, 随造模时间增加, 模型建模能力逐步提高, 从第 4 周开始模型预测能力均大于 50%, 表明模型具有良好的拟合度和预测能力。第 8 周时 97% 的样本均符合模型判别, 模型的预测能力达到 85%。

3.2 蒙古扁桃石油醚提取物对肝纤维化大鼠血清差异代谢物的影响

课题组前期在实验第 8 周时, 根据 $VIP>2$ 、

$P<0.05$, 筛选鉴定出 46 种差异代谢物^[17]。为探究蒙古扁桃石油醚提取物对这些差异代谢物的影响, 对每组差异代谢物的变化趋势做热图聚类分析, 如图 2-A 所示, 模型组与对照组显著分开, 给药组靠近对照组聚类, 并对模型组扰动的肝纤维化差异代谢物具有回调作用。对模型组与对照组、给药组与模型组进行显著性差异比较, 以 P 值热图展示, 如图 2-B 所示。

根据结果, 基于 ANOVA 分析, 统计与模型组比

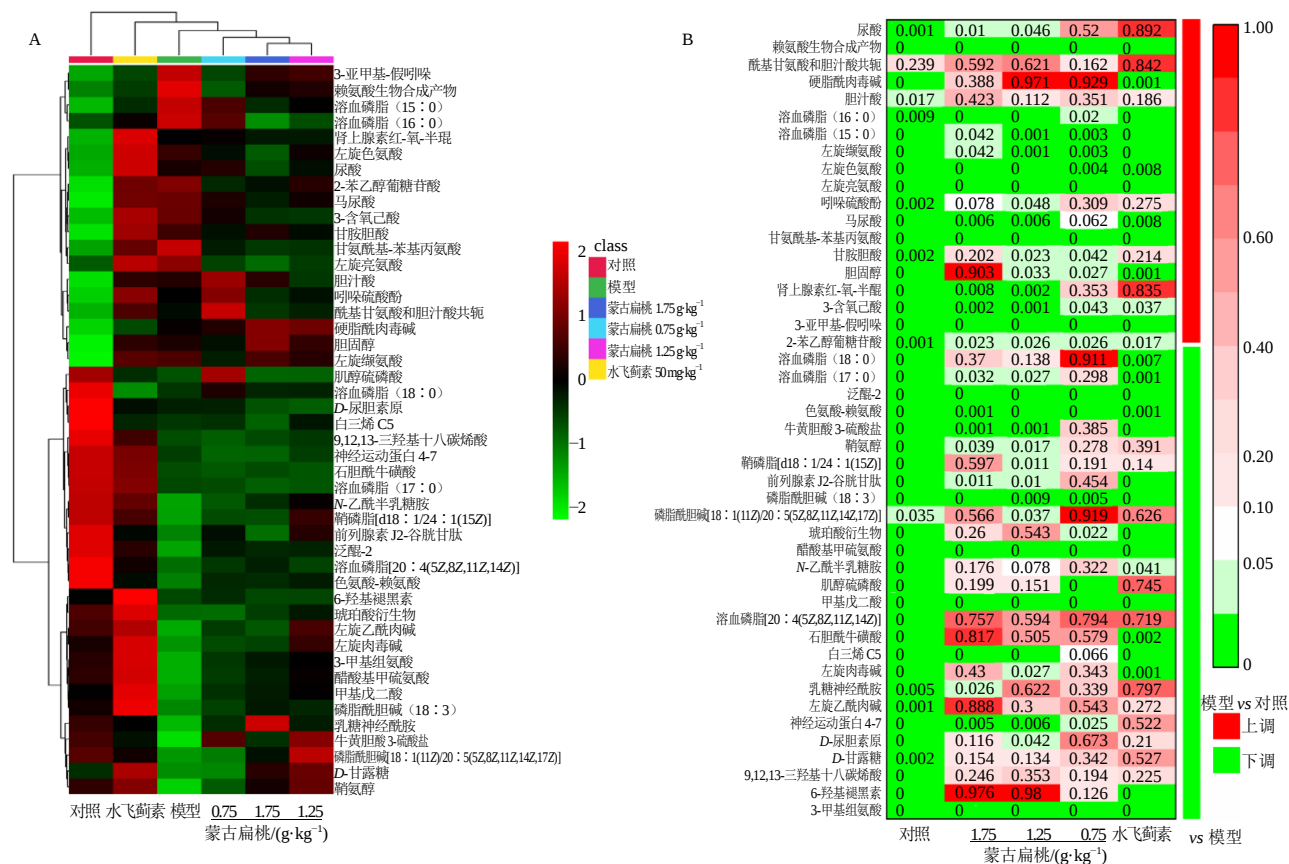


图 2 各组大鼠血清差异代谢物层次聚类热图 (A) 和 P 值热图 (B)

Fig. 2 Hierarchical clustering heat map (A) and P value heat map (B) of differential metabolites in serum of rats in each group

较, 各给药组可显著回调的差异代谢物个数, 以韦恩图展示, 如图 3 和表 1 所示, 在模型组显著下调的 27 个差异代谢物中, 蒙古扁桃高、中、低剂量组可分别回调 8、10、6 个 ($P<0.05$); 在模型组显著上调的 19 个差异代谢物中, 蒙古扁桃高、中、低剂量组可分别显著回调 13、16、13 个 ($P<0.05$)。蒙古扁桃高、中、低剂量组可共同作用 16 个差异代谢物。

3.3 蒙古扁桃石油醚提取物对肝纤维化大鼠在疾病发展各阶段的血清关键生物标志物的影响

课题组前期对模型组和对照组大鼠血清中初步鉴定的 46 种差异代谢物进行了 MetPA, 共筛选出

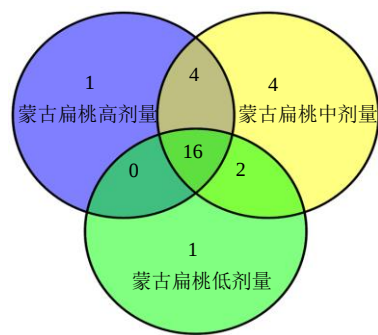


图 3 蒙古扁桃石油醚提取物回调差异代谢物韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of restored differential metabolites by petroleum ether extract from *A. mongolica*

表 1 蒙古扁桃石油醚提取物回调差异代谢物韦恩图结果

Table 1 Results of venn diagram about restored differential metabolites by petroleum ether extract from *A. mongolica*

交集组别	数量	模型 vs 对照	
		上调差异代谢物	下调差异代谢物
蒙古扁桃高剂量	1	—	乳糖神经酰胺
蒙古扁桃中剂量	3	吡啶硫酸酚	左旋肉碱、鞘磷脂、磷脂酰胆碱[18:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]
蒙古扁桃低剂量	1	肌醇六磷酸	—
蒙古扁桃低、中、高剂量	16	2-苯乙醇葡萄糖苷酸、3-亚甲基-假吡啶、3-含氧己酸、甘氨酸、L-亮氨酸、L-色氨酸、L-缬氨酸、溶血磷脂(15:0)、溶血磷脂(16:0)、赖氨酸生物合成中间产物	3-甲基组氨酸、甲基戊二酸、N-乙酰半乳糖胺、泛醌-2、磷脂酰胆碱(18:3)、色氨酸-赖氨酸
蒙古扁桃中、高剂量	4	肾上腺素红-氧-半醌、马尿酸、尿酸	鞘氨醇
蒙古扁桃低、中剂量	2	胆固醇、甘氨酸	—

4 条主要参与肝纤维化发生发展的代谢通路,包括鞘脂类代谢,缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成与降解,初级胆汁酸合成,甘油磷脂代谢,通路中所对应的代谢物筛选为影响肝纤维化进展的关键潜在生物标志物^[17]。该关键生物标志物的质谱鉴定和代谢通路信息如表 2 所示。为探究蒙古扁桃石油醚提取物在肝纤维不同发展阶段对这些关键标志物的干预作用规律,9 个关键潜在生物标志物在各组中不同时间点的含量变化如图 4 所示。第 2 周 7 个代谢物鞘氨醇、鞘磷脂、L-亮氨酸、L-缬氨酸、溶血磷脂(17:0)、磷脂酰胆碱[18:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]、胆固醇的含量发生显著变化,随疾病发展模型组大鼠血清标志物呈逐步升高或降低趋势($P<0.05$ 、 0.01),提示这些标志物参与疾病进展全

过程,有望成为早期检测肝纤维化发生、发展的潜在生物标志物。鞘氨醇在第 8 周可被蒙古扁桃高、中剂量组显著回调($P<0.05$ 、 0.01);磷脂酰胆碱水平在第 8 周可被蒙古扁桃中剂量组显著升高($P<0.05$);鞘磷脂在第 4 周可被蒙古扁桃高、中剂量组显著回调($P<0.05$ 、 0.01),第 8 周蒙古扁桃中剂量组对其有回调作用($P<0.01$);L-亮氨酸、L-缬氨酸在第 8 周均可被各给药组回调($P<0.05$ 、 0.01);胆固醇在第 4 周可被蒙古扁桃高、中剂量组回调($P<0.05$ 、 0.01),第 8 周可被蒙古扁桃中、低剂量组显著回调($P<0.05$)。甘氨酸和乳糖神经酰胺在第 8 周发生显著变化($P<0.05$),提示其可能为晚期肝纤维化诊断提供重要信息。蒙古扁桃中、低剂量组显著降低甘氨酸水平,高剂量可显著回调乳糖神经酰胺水平($P<0.05$)。

表 2 肝纤维化大鼠血清关键差异代谢物鉴定结果

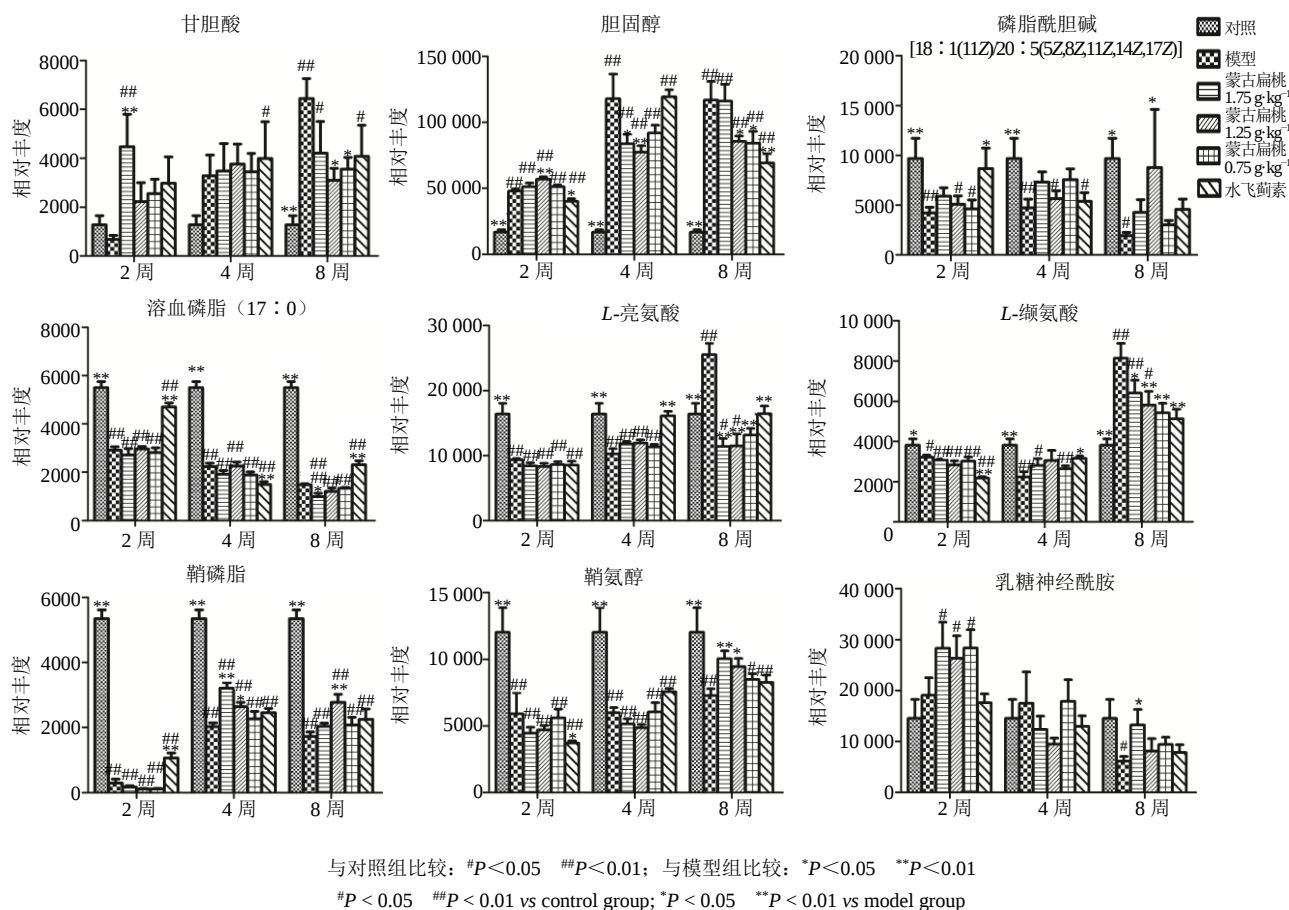
Table 2 Results of identified key biomarkers from rats with hepatic fibrosis

编号	m/z	tr/min	VIP	HMDB ID	化学式	差异代谢物	代谢通路
1	302.31	8.96	3.91	HMDB00269	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	鞘氨醇	鞘脂类代谢
2	857.67	12.94	5.42	HMDB12107	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	鞘磷脂	
3	806.57	12.79	3.87	HMDB04866	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₃	乳糖神经酰胺	
4	132.10	1.30	4.62	HMDB00687	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-亮氨酸	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成
5	118.09	0.65	3.05	HMDB00883	C ₅ H ₁₁ NO ₂	L-缬氨酸	
6	508.34	12.23	5.77	HMDB12108	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	溶血磷脂(17:0)	甘油磷脂代谢
7	850.56	12.96	5.45	HMDB08083	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	磷脂酰胆碱[18:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]	
8	369.35	11.67	15.38	HMDB00067	C ₂₇ H ₄₆ O	胆固醇	初级胆汁酸合成
9	464.30	6.76	5.35	HMDB00138	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	甘氨酸	

4 讨论

肝纤维化的发生为动态进展式病理过程,利用代谢组学技术进行药物疗效动态监测,对药物的药效评价及作用机制研究具有重要意义。课题组前期运用气相色谱-质谱联用技术对蒙古扁桃药材石油醚提取物进行成分分析,发现不饱和脂肪酸为其主要成分,占脂肪酸总量 73.2%,其中单不饱和脂肪酸(油酸和亚油酸)占 67.56%^[14]。研究表明,富含油酸等单不饱

和脂肪酸的膳食油和药物可通过改善血脂异常、降低脂质过氧化和胶原沉积预防多种疾病,如降低心血管疾病发生率、改善胰岛素抵抗、防治非酒精性脂肪肝和肝纤维化^[18-22]。因此,不饱和脂肪酸为蒙古扁桃发挥抗肝纤维化重要物质基础。本实验基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术,探究蒙古扁桃石油醚提取物对不同发展阶段肝纤维化大鼠代谢轮廓及内源性生物标志物的影响,以揭示其作用靶点与途径。

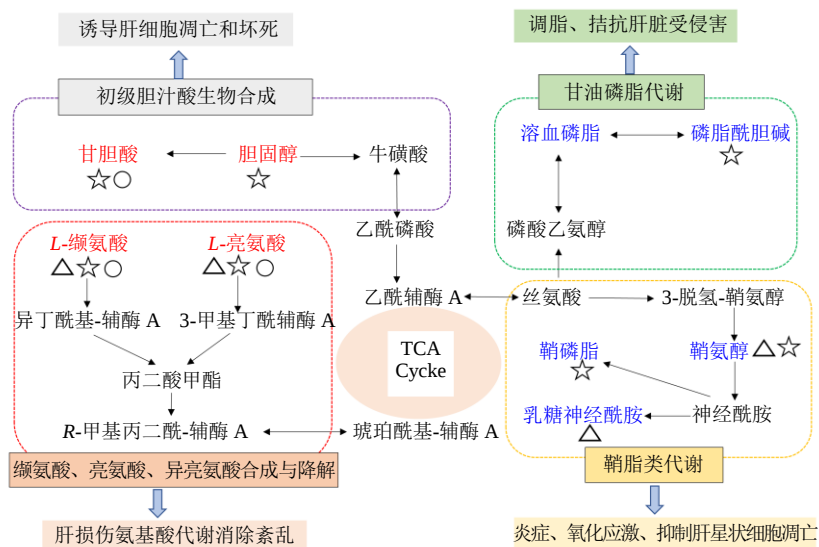
图 4 大鼠血清肝纤维化关键生物标志物在不同时间点的含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 4 Changes of relative intensity of nine serum key biomarkers during hepatic fibrosis progression ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

PLS-DA 结果显示, 在肝疾病发展过程中, 各时间点的模型组与对照组血清样本均呈不同聚类, 第 2~8 周蒙古扁桃石油醚提取物组与模型组聚类逐步分离, 并向对照组移动, 提示蒙古扁桃石油醚提取物可纠正模型组肝纤维化疾病发展各阶段代谢谱, 恢复机体代谢紊乱。第 8 周与对照组比较, 模型组经筛选鉴定共得到 9 个与肝纤维化发生发展密切相关的血清潜在关键生物标志物, 主要参与鞘脂类代谢, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成与降解, 初级胆汁酸合成, 甘油磷脂代谢。这些代谢通路所对应的差异代谢物相互影响, 在疾病过程中起着关键作用。蒙古扁桃石油醚提取物对这些生物标志物有不同程度回调作用, 且不同剂量之间影响趋势不同。为了探究蒙古扁桃发挥抗肝纤维化的主要干预靶点和代谢途径, 根据京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库和相关文献构建关键差异代谢物-代谢途径-靶点网络图, 如图 5 所示。按照不同的代谢途径, 查询文献阐释关键信号途径及其对应的潜在

生物标志物与肝纤维化的相关性, 并根据蒙古扁桃石油醚提取物对这些代谢物及代谢途径的影响, 进而揭示其抗肝纤维化可能的作用机制。

4.1 蒙古扁桃参与缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成与降解

亮氨酸和缬氨酸为支链氨基酸, 用于蛋白合成。由亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸组成的混合支链氨基酸可通过调节转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) /Smad 信号通路和白细胞介素, 从而改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化^[23]。Nakanishi 等^[24]发现 L-缬氨酸可以通过减少肝细胞的促血小板生成素减轻肝脏疾病, 并促进受损肝脏恢复而改善肝纤维化。研究表明, 乙肝、肝硬化、肝癌患者的支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸) 与芳香族氨基酸 (酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸) 比值较正常者显著降低, 提示肝脏疾病患者中缬氨酸、亮氨酸分解代谢增加, 色氨酸分解代谢减少^[25]。本研究结果显示, 在肝纤维化早、中期 (第 2~4 周), 支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸) 水平显著降低, 与文献报道结果一致;



红色或蓝色字体表示：模型组 vs 对照组，第 8 周显著上调（红色）和下调（蓝色）的关键生物标志物；△、☆、○分别表示：蒙古扁桃高、中、低剂量组 vs 模型组，有显著差异生物标志物（ $P < 0.05$ ）

Key biomarkers in red and blue represent increase and decrease levels at week 8 respectively, model group vs control group; “rectangle”, “stars” and “circle” respectively represent significant differential biomarkers, A. mongolica high-, middle-, low-dose group vs model group ($P < 0.05$)

图 5 蒙古扁桃石油醚提取物抗肝纤维化的潜在作用靶点和代谢通路网络

Fig. 5 Potential target of *A. mongolica* petroleum ether extract for anti-HF and network of metabolic pathways

肝纤维化晚期（第 8 周）支链氨基酸（缬氨酸、亮氨酸）水平升高，推测可能是由于肝脏持续损伤后，糖皮质激素、儿茶酚胺类激素等分泌增加、灭活减少、分解代谢升高，促进机体内源性蛋白质分解，从而释放了大量的氨基酸，而肝脏代谢和消除氨基酸作用不等，造成血循环中氨基酸水平增加。蒙古扁桃石油醚提取物组在第 8 周显著回调过高的 *L*-亮氨酸和 *L*-缬氨酸水平，提示其可参与氨基酸代谢，改善肝纤维化。

4.2 蒙古扁桃参与鞘脂类代谢

鞘脂类代谢在脂肪肝、肝纤维化等肝脏疾病发展中发挥着至关重要的作用^[26-28]。鞘脂类代谢参与炎症反应、神经酰胺合成和多种信号传导，如细胞增殖、分化和凋亡等，在器官纤维化的形成、发展过程中起着重要调节作用^[28-31]。鞘脂类中神经酰胺能够抑制活化的肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSC）凋亡而导致 ECM 过度沉积，并增加肝细胞对各种刺激的敏感性而促进肝损伤，此外还参与由氧化应激和细胞外如脂多糖和促炎细胞因子引起的炎症反应^[30]。因此，鞘脂类神经酰胺表达升高将促使肝纤维化的发生、发展。神经酰胺由 1 个长链鞘氨醇类组成，在细胞内的合成来源为丝氨酸、鞘磷脂、神经鞘氨醇。研究表明，肝纤维化大鼠血清鞘氨醇水平降低，合成大量神经酰胺应答炎症反应^[26]。本研究发现，在肝纤维化大鼠疾病发展各阶段血清

鞘氨醇和鞘磷脂水平降低，推测鞘脂类代谢影响肝纤维化疾病的发生、发展全过程。给予蒙古扁桃石油醚提取物 4 周时，血清鞘磷脂显著回调；8 周时，血清鞘磷脂、鞘氨醇、乳糖神经酰胺均显著回调，推测长期给予蒙古扁桃可在肝纤维化晚期通过调节鞘脂类代谢参与氧化应激、炎症反应，促进活化 HSC 凋亡，从而发挥抗肝纤维化作用。

4.3 蒙古扁桃参与初级胆汁酸生物合成

胆汁酸是胆汁的重要成分，在脂肪代谢中起着重要作用。当肝或肠道疾病发生时，胆汁酸代谢平衡（合成、再吸收、排泄）受到破坏，总胆汁酸水平升高^[32]。胆汁酸被认为是肝损伤的标志，胆汁酸可通过诱导肝细胞凋亡和坏死促进肝损伤，最终发展为肝硬化或肝衰竭^[33]。本研究结果显示，胆汁酸的共轭胆酸（胆固醇和甘胆酸）分别在肝纤维化各阶段和第 8 周显著升高，表明血清脂质代谢与肝纤维化的发生、发展密切相关。蒙古扁桃石油醚提取物高、低剂量组可显著降低第 4、8 周的胆固醇水平和第 8 周的甘胆酸水平，与课题组前期研究中蒙古扁桃石油醚提取物对高脂血症大鼠调脂作用的结果一致^[14]。提示早期给予蒙古扁桃可降低肝纤维化中、晚期脂质水平，减少肝损伤。

4.4 蒙古扁桃参与甘油磷脂代谢

磷脂酰胆碱为肝脏重要营养来源，可以拮抗肝

脏受病毒、药物、酒精及其他有毒物质的侵害,还可降低血清中胆固醇水平,防止肝纤维化、肝硬化^[34]。溶血磷脂在肝损伤中发挥重要作用,在肝损伤的早期阶段,溶血磷脂不足反映磷脂酰胆碱不足^[35]。本研究结果与文献报道一致,磷脂酰胆碱和溶血磷脂(17:0)水平分别在肝纤维化第 8 周和 2~8 周显著降低,蒙古扁桃石油醚中剂量组第 8 周上调磷脂酰胆碱水平,参与甘油磷脂代谢抗肝纤维化。

综上所述,肝纤维化的发生发展存在炎症反应、氧化应激、氨基酸代谢紊乱。这些生物标志物之间相互联系,相互影响构成网络体共同参与肝纤维化的发生发展。给予蒙古扁桃石油醚提取物 2 周未见对肝纤维化早期变化生物标志物产生回调;中期(第 4 周)主要通过作用于胆固醇、鞘磷脂,减轻肝损伤,延缓肝纤维化形成;晚期(第 8 周)可回调 8 个关键生物标志物包括鞘磷脂、鞘氨醇、乳糖神经酰胺、磷脂酰胆碱、胆固醇、肝胆酸、亮氨酸和缬氨酸,参与鞘脂类、甘油磷脂代谢,初级胆汁酸生物合成,缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成与降解,从而发挥抗纤维化作用;蒙古扁桃石油醚提取物中剂量对代谢谱回调趋势更明显,对差异代谢物和关键生物标志物回调数量较多,抗肝纤维化效果较佳。本研究从代谢组角度阐释蒙古扁桃石油醚提取物的作用机制,为蒙古扁桃的开发利用提供了一定的实验依据,并为其临床安全有效应用提供参考。课题组后续将进一步验证本研究筛查得到的关键生物标志物,并深入研究具有重要生物学意义的代谢物,通过相关调控蛋白将内源性代谢物与疾病的调控基因整合,获取更加全面可靠的疾病发病机制和蒙古扁桃抗纤维化的作用机制,为蒙古扁桃有效干预靶点提供更准确、可靠信息。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee Y A, Wallace M C, Friedman S L. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story [J]. *Gut*, 2015, 64(5): 830-841.
- [2] 徐文丽, 胡瑞雪, 梁元昊, 等. 中医中药代谢组学生物标记物的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6): 756-760.
- [3] Pang H H, Jia W, Hu Z P. Emerging applications of metabolomics in clinical pharmacology [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 106(3): 544-556.
- [4] Zhang A H, Sun H, Yan G L, Ying Han, et al. Chinmedomics: A powerful approach integrating metabolomics with serum pharmacology to evaluate the efficacy of traditional Chinese medicine [J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 60-68.
- [5] 赵一之. 蒙古扁桃的植物区系地理分布研究 [J]. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 1995, 26(6): 713-715.
- [6] 斯琴巴特尔. 蒙古扁桃 [J]. *生物学通报*, 2003, 38(8): 23-24.
- [7] 赵国平. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1856.
- [8] 贾小叶, 高晨, 刘庆, 等. 蒙古扁桃药材总生物碱的含量测定 [J]. *广州化工*, 2018, 46(19): 100-102.
- [9] 石松利, 白迎春, 周红兵, 等. 蒙古扁桃药材中多糖的提取及含量测定 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(2): 257-258.
- [10] 苏琨, 石松利, 郑东华, 等. HPLC 测定蒙古扁桃种仁中 α -维生素 E 的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(12): 70-72.
- [11] 白万富, 石松利, 周红兵, 等. 不同产地蒙古扁桃仁中苦杏仁苷的含量比较 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(3): 315-317.
- [12] 石松利, 白迎春, 程向晖, 等. 蒙古扁桃药材中总黄酮提取及含量测定 [J]. *包头医学院学报*, 2012, 28(1): 12-13.
- [13] 郑东华, 石松利, 苏琨. 蒙古扁桃药材中有机酸含量的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(3): 515-516.
- [14] 郑倩男, 苏琨, 石松利, 等. 蒙古扁桃药材石油醚提取物的成分分析及其对降血脂作用的量效关系和抗氧化方面的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 287-290.
- [15] 吴桐, 常虹, 石松利, 等. 蒙古扁桃石油醚提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3): 595-598.
- [16] Chang H, Liu Q, Bai W F, et al. Protective effects of *Amygdalus mongolica* on rats with renal fibrosis based on serum metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112858.
- [17] Chang H, Meng H Y, Liu S M, et al. Identification of key metabolic changes during liver fibrosis progression in rats using a urine and serum metabolomics approach [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11433.
- [18] Kim G W, Jo H K, Chung S H. Ginseng seed oil ameliorates hepatic lipid accumulation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(4): 419-428.
- [19] Massaro M, De Caterina R. Vasculoprotective effects of oleic acid: Epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2002, 12(1): 42-51.
- [20] Hong L N, Zahradka P, Cordero-Monroy L, et al. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid

- (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in fa/fa zucker rats [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): E917.
- [21] Zhang K, Chang Y N, Shi Z M, *et al.* Ω -3 PUFAs ameliorate liver fibrosis and inhibit hepatic stellate cells proliferation and activation by promoting YAP/TAZ degradation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30029.
- [22] Wang H L. Effects of dietary lipids against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats: A proteomic approach [D]. Hong Kong: The University of Hong Kong, 2013.
- [23] Khedr N F, Khedr E G. Branched chain amino acids supplementation modulates TGF- β 1/Smad signaling pathway and interleukins in CCl₄-induced liver fibrosis [J]. *Fund Clin Pharmacol*, 2017, 31(5): 534-545.
- [24] Nakanishi C, Doi H, Katsura K, *et al.* Treatment with L-valine ameliorates liver fibrosis and restores thrombopoiesis in rats exposed to carbon tetrachloride [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 221(2): 151-159.
- [25] Gao R, Cheng J H, Fan C L, *et al.* Serum metabolomics to identify the liver disease-specific biomarkers for the progression of hepatitis to hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18175.
- [26] Wang G, Li Z H, Li H, *et al.* Metabolic profile changes of CCl₄-liver fibrosis and inhibitory effects of Jiaqi Ganxian Granule [J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 698.
- [27] Simon J, Ouro A, Ala-Ibanibo L, *et al.* Sphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Ceramide turnover [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 40.
- [28] Régnier M, Polizzi A, Guillou H, *et al.* Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases [J]. *Biochimie*, 2019, 159: 9-22.
- [29] Ghidoni R, Caretti A, Signorelli P. Role of sphingolipids in the pathobiology of lung inflammation [J]. *Mediat Inflamm*, 2015, 2015: 487508.
- [30] Li J F, Qu F, Zheng S J, *et al.* Plasma sphingolipids as potential indicators of hepatic necroinflammation in patients with chronic hepatitis C and normal alanine aminotransferase level [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95095.
- [31] Shea B S, Tager A M. Sphingolipid regulation of tissue fibrosis [J]. *Open Rheumatol J*, 2012, 6: 123-129.
- [32] Song Y N, Zhang G B, Lu Y Y, *et al.* Huangqi decoction alleviates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis: An analysis of bile acids metabolic mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 148-156.
- [33] Zhou C, Jia H M, Liu, Y T, *et al.* Metabolism of glycerophospholipid, bile acid and retinol is correlated with the early outcomes of autoimmune hepatitis [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(5): 1574-1585.
- [34] Bernhard W, Lange R, Graepler-Mainka U, *et al.* Choline supplementation in cystic fibrosis-the metabolic and clinical impact [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 656.
- [35] Tang Y M, Wang J P, Bao W M, *et al.* Urine and serum metabolomic profiling reveals that bile acids and carnitine may be potential biomarkers of primary biliary cirrhosis [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(2): 377-385.

[责任编辑 李亚楠]