

## • 药理与临床 •

## 基于初级胆汁酸合成探讨乳香醋炙对溃疡性结肠炎的增效机制

彭诗涛<sup>1</sup>, 刘振丽<sup>1</sup>, 王 淳<sup>1</sup>, 张琳琳<sup>2</sup>, 万晓莹<sup>1</sup>, 宋志前<sup>1\*</sup>, 宁张弛<sup>1\*</sup>

1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 浙江省食品药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 浙江 杭州 310052

**摘要:**目的 从对初级胆汁酸合成的影响, 探讨醋炙增强乳香改善溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制。方法 基于 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 法建立 UC 大鼠模型, 采用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-TQ-MS) 法测定大鼠血浆中 6 种初级胆汁酸含量; 进一步借助 L-02 肝细胞模型, 围绕初级胆汁酸合成场所肝脏, 探究乳香醋炙前后及醋炙前后差异成分 3-乙酰-9,11-去氢- $\beta$ -乳香酸 (3-acetyl-9,11-dehydro- $\beta$ -boswellic acid, ADHBA) 的干预作用, 以 ELISA 法考察胆汁酸前体胆固醇变化, 采用 qRT-PCR 法测定游离型初级胆汁酸合成酶胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1)、甾醇 12 $\alpha$ -羟化酶 (sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase, CYP8B1)、甾醇-27-羟化酶 (27-hydroxycholesterol, CYP27A1)、氧甾醇-7 $\alpha$ -羟化酶 (oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7B1)、结合型初级胆汁酸合成酶胆汁酰基辅酶 A 合成酶 (bile acyl-CoA synthetase, BACS) 和胆汁酸-辅酶 A: 氨基酸正酰基转移酶 (bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase, BAAT) mRNA 表达水平。**结果** 乳香醋炙后, 对 UC 模型大鼠血浆中的初级胆汁酸总量和游离型、结合型初级胆汁酸总量的回调水平更接近正常组。乳香、醋乳香、醋炙前后差异成分 ADHBA 均可降低胆汁酸合成前体胆固醇水平, 但以醋乳香及 ADHBA 的调控作用更加明显。醋乳香对游离型初级胆汁酸合成经典途径中 CYP7A1 的抑制和 CYP8B1 的上调作用以及对结合型初级胆汁酸合成酶 BACS、BAAT 的上调作用强于乳香组, 乳香联合 ADHBA 组同醋乳香组上调作用一致。**结论** 乳香醋炙后对初级胆汁酸合成调控作用主要是基于其对游离型初级胆汁酸经典合成途径中限速酶 CYP7A1 的抑制, 回调机体在 UC 病理状态下的初级胆汁酸水平, 进而增强乳香对 UC 的改善作用; ADHBA 可能为乳香醋炙增效的物质基础之一。

**关键词:** 乳香; 醋炙; 初级胆汁酸; 溃疡性结肠炎; 增效; 胆固醇-7 $\alpha$ -羟化酶; 3-乙酰-9,11-去氢- $\beta$ -乳香酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0107-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.014

Study on efficiency enhancing mechanism of vinegar processed *Olibanum* on ulcerative colitis via primary bile acids synthesisPENG Shi-tao<sup>1</sup>, LIU Zhen-li<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, ZHANG Lin-lin<sup>2</sup>, WAN Xiao-ying<sup>1</sup>, SONG Zhi-qian<sup>1</sup>, NING Zhang-chi<sup>1</sup>

1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Hangzhou 310052, China

**Abstract: Objective** To investigate the efficiency enhancing mechanism for ulcerative colitis (UC) of vinegar processed Ruxiang (*Olibanum*) from the aspect of primary bile acids synthesis. **Methods** UPLC-TQ-MS was used to determine the contents of six primary bile acids in plasma of UC rats induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). At the cellular level, L-02 cell line was

收稿日期: 2021-07-23

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81873009); 国家自然科学基金资助项目 (82003950); 中国中医科学院优秀青年科技人才 (创新类) 基金资助项目 (ZZ14-YQ-035); 中国中医科学院中医基础理论研究所中央级科研院所自主选题 (YZ-202023, YZ-202045); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04201)

**作者简介:** 彭诗涛 (1993—), 女, 在读博士生, 研究方向为中药炮制原理研究。Tel: 18810820973 E-mail: pst082073@163.com

**\*通信作者:** 宁张弛, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中药药效物质基础与质量评价研究。

Tel: (010)64089020 E-mail: yizhangyichi1573@sina.com

宋志前, 男, 副主任技师, 主要从事中药药效物质基础和炮制原理研究。

applied to compare the effects of *Olibanum*, vinegar processed *Olibanum* and the different components of 3-acetyl-9,11-dehydro- $\beta$ -boswellic acid (ADHBA) on synthesis of primary bile acids. The content of bile acid synthesis precursor cholesterol was measured by ELISA. mRNA expressions of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7A1*), sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP8B1*), 27-hydroxycholesterol (*CYP27A1*), oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7B1*), bile acyl-CoA synthetase (*BACS*) and bile acid-CoA: amino acid *N*-acyltransferase (*BAAT*) were determined by qRT-PCR. **Results** Level of total amount of primary bile acids and free and conjugated primary bile acids in the plasma of UC rats fed with vinegar processed *Olibanum* was closer to that of normal rats. *Olibanum*, vinegar processed *Olibanum* and ADHBA could reduce cholesterol level, but the effect of vinegar processed *Olibanum* and ADHBA were more obvious. The inhibition of vinegar processed *Olibanum* on the classical pathway of free primary bile acid synthesis *CYP7A1*, the up-regulation of *CYP8B1*, *BACS* and *BAAT* were higher than those of *Olibanum*. *Olibanum* combined with ADHBA exhibited the same effect with vinegar processed *Olibanum*. **Conclusion** The inhibition of rate-limiting enzyme *CYP7A1* in the classical synthesis pathway plays a significant role on regulation of primary bile acid synthesis by vinegar processed *Olibanum*, which resulted in the reduction of primary bile acid level in pathological state of UC. ADHBA is proved to be one of the material foundations of processing efficiency.

**Key words:** *Olibanum*; vinegar processed; primary bile acids; ulcerative colitis; efficiency enhancing; *CYP7A1*; ADHBA

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因尚不明确的结肠和直肠慢性非特异性疾病。临床主要表现为腹泻、腹痛及黏液脓血便<sup>[1]</sup>。近年来, UC 发病率呈逐年增高趋势<sup>[2]</sup>, 已成为严重威胁人类健康的疾病之一。中医学将 UC 归属于“肠癖”“泄泻”“痢疾”等范畴。刘元素的《素问玄机原病式》对其病机进行了阐述, 指出: “诸泻痢皆属于湿, 湿热甚于肠胃之内, 而肠胃怫郁, 以致气液不得宣通而成”。湿热滞留于大肠, 与气血相搏结, 使肠道传导失司、脂络受伤、气凝血滞, 继而血败肉腐化脓。“化瘀行气”是中医临床治疗遵循的法则之一<sup>[3]</sup>。

乳香具有活血行气化瘀、消肿止痛的功效, 为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 及同属植物 *B. bhaw-dajiana* Birdw. 树皮渗出的树脂<sup>[4]</sup>。临床研究证实, 乳香醇制剂对 UC 有很好的疗效, 80% 的患者服用后病情得到缓解<sup>[5]</sup>, 其对慢性结肠炎 II、III 级患者有效率分别为 100% 和 60%<sup>[5-6]</sup>。炮制是中医临床用药特色。传统炮制理论认为, 乳香经过醋炙后, 可以增强其活血行气止痛的功效, 降低刺激性<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究显示, 乳香和醋乳香均可改善 UC 模型大鼠结肠病变和炎性细胞因子水平, 且醋炙后作用增强<sup>[8]</sup>, 并从醋炙前后化学成分的变化<sup>[9-12]</sup>、醋中活性成分作用<sup>[13]</sup>以及醋炙后活性成分吸收增强角度<sup>[14]</sup>, 对增效原因进行了研究。其中, 3-乙酰-9,11-去氢- $\beta$ -乳香酸(3-acetyl-9,11-dehydro- $\beta$ -boswellic acid, ADHBA) 在乳香醋炙后含量增加 10 倍以上<sup>[9]</sup>, 是值得关注的的主要差异成分之一。

胆汁酸与 UC 等肠道疾病关系密切<sup>[15]</sup>。肠道 UC 状态可扰动机体内初级胆汁酸水平发生变化<sup>[16-17]</sup>。肝脏是胆汁酸合成的主要部位。在肝脏中, 胆固醇

在胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, *CYP7A1*)、甾醇 12 $\alpha$ -羟化酶 (sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase, *CYP8B1*)、甾醇-27-羟化酶 (27-hydroxycholesterol, *CYP27A1*)、氧甾醇-7 $\alpha$ -羟化酶 (oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylase, *CYP7B1*) 作用下生成游离型初级胆汁酸, 即胆酸 (cholic acid, CA) 和鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)。CA、CDCA 再通过结合型初级胆汁酸合成酶胆汁酰基辅酶 A 合成酶 (bile acyl-CoA synthetase, *BACS*) 和胆汁酸-辅酶 A: 氨基酸正酰基转移酶 (bile acid-CoA: amino acid *N*-acyltransferase, *BAAT*) 作用与甘氨酸或牛磺酸结合, 产生结合型初级胆汁酸牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA)、甘氨酸胆酸 (glycocholic acid, GCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA) 和甘氨酸鹅去氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA) <sup>[18]</sup>。

为探究醋炙增强乳香对 UC 改善作用的本质, 本研究基于 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 法构建 UC 模型, 建立初级胆汁酸含量测定方法, 明确乳香醋炙前后对机体初级胆汁酸水平的影响。通过探究乳香醋炙前后对胆固醇、初级胆汁酸合成酶 *CYP7A1*、*CYP27A1*、*CYP7B1*、*CYP8B1*、*BACS* 与 *BAAT* 的作用, 从初级胆汁酸合成角度揭示乳香醋炙增效的机制。

## 1 材料

### 1.1 血浆样本

血浆样本来自于正常、UC 模型、乳香 (0.45 g/kg, 临床等效剂量)、醋乳香 (0.45 g/kg, 临床等效剂量) 组大鼠, 为本课题组前期进行乳香醋炙前后对 UC 大鼠抗炎作用对比研究实验所收集<sup>[8]</sup>。

## 1.2 饮片

乳香购自北京同仁堂药店,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为橄榄科植物乳香树 *B. carterii* Birdw.树皮渗出的树脂。醋乳香为实验室自制,经检查符合《中国药典》2020年版标准<sup>[4]</sup>。

## 1.3 药品与试剂

ADHBA 为实验室自制(质量分数 $\geq 95\%$ );对照品 CA(批号 T16J8Q28663)、CDCA(批号 Z01011LA14)、TCA(批号 M26A8E42428)、GCA(批号 Y08O7K22248)、TCDCA(批号 DST180920-031)、GCDCA(批号 Y29M9K57235)均购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ ;对照品 GCA-d4(批号 739723)、CA-d4(批号 614149)、DCA-d4(批号 614130)均购自美国 Sigma 公司,质量分数均 $\geq 98\%$ ; *CYP7A1*、*CYP8B1*、*CYP27A1*、*CYP7B1*、*BACS*、*BAAT*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成;DMEM 高糖培养基(批号 11965092)、胎牛血清(批号 10099141)均购自美国 Gibco 公司;胆固醇 ELISA 测定试剂盒(批号 CEB701Ge)购自武汉云克隆科技股份有限公司;Trizol 试剂(批号 ET101-01)、Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR 试剂盒(批号 AT341-01)、Trans Script Top Green qPCR Super Mix 试剂盒(批号 AT131-01)均购自北京全式金生物技术有限公司。

## 1.4 仪器

Waters Xevo TQ-S micro 质谱仪(美国 Waters 公司);CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);LWFS31310T 型实验室水纯化系统[颇尔富迪生物分析仪器(上海)有限公司];VORTEX2 型涡旋振荡器(德国 IKA 公司);TGL-16B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、-80 °C Freezer 超低温冰箱、NANODROP 2000c 型分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CFX-96 型 qRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 乳香醋炙前后对 UC 大鼠血浆中初级胆汁酸含量的影响

**2.1.1 系列混合对照品溶液的制备** 分别取 CA、TCA、GCA、CDCA、TCDCA、GCDCA 对照品适量,精密称定,加甲醇制成各对照品溶液浓度为 30 mmol/L 的储备液。精密吸取适当体积的各储备

液,混匀,制成上述各成分浓度分别为 2 716.79、2 365.72、2 083.33、2 445.36、2 055.23、2 513.23  $\mu\text{mol/L}$  的混合对照品溶液。通过对混合对照品溶液进行倍比稀释,得系列混合对照品溶液。此外,设定混合对照品溶液浓度的 1/2、1/4、1/8 为高、中、低 3 个浓度,进行后续方法学考察。

**2.1.2 内标混合溶液的制备** 分别取 GCA-d4、CA-d4、DCA-d4 对照品适量,精密称定,加甲醇制成浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的内标储备液。分别精密吸取各储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,得内标混合溶液。

**2.1.3 血浆供试品前处理方法** 精密吸取各组大鼠待测血浆 50  $\mu\text{L}$ ,分别精密加入甲醇 200  $\mu\text{L}$  及内标混合溶液 50  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s,充分混合,4 °C、14 000 r/min 离心 10 min。精密吸取上清液 200  $\mu\text{L}$ ,氮吹干燥后,精密加入甲醇 50  $\mu\text{L}$ ,充分溶解,即得。

### 2.1.4 质控系列样品制备

(1) 质控样品制备:精密等量吸取各组血浆供试品于离心管中,涡旋混匀,即得。

(2) 提取前加入对照品的质控样品制备:精密吸取 50  $\mu\text{L}$  质控样品,共 6 份,分别精密加入 50  $\mu\text{L}$  内标混合溶液及 50  $\mu\text{L}$  高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液、150  $\mu\text{L}$  甲醇,涡旋 10 s,4 °C、14 000 r/min 离心 10 min。取 200  $\mu\text{L}$  上清液,氮吹干燥后,精密加入 50  $\mu\text{L}$  甲醇,充分溶解,即得。

(3) 提取后加入对照品的质控样品制备:精密吸取 50  $\mu\text{L}$  质控样品,共 6 份,分别精密加入 50  $\mu\text{L}$  内标混合溶液及 200  $\mu\text{L}$  甲醇,涡旋混合 10 s,4 °C、14 000 r/min 离心 10 min。取 200  $\mu\text{L}$  上清液,氮吹干燥后,分别精密加入 50  $\mu\text{L}$  高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液,充分溶解,即得。

**2.1.5 色谱条件** Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱:0~6.0 min, 25%~40% B; 6.0~20.0 min, 40%~70% B; 20.0~20.1 min, 70%~100% B; 20.1~23.0 min, 100% B; 23.0~23.1 min, 100%~25% B; 23.1~25.0 min, 25% B;弱洗溶剂为水-乙腈(95:5),强洗溶剂为异丙醇;体积流量为 0.2 mL/min;柱温为 40 °C;自动进样器温度为 10 °C;进样量为 2  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.6 质谱条件** 质谱采用电喷雾电离源(ESI);毛细管电压为 3.5 kV;离子源温度为 150 °C;去溶剂温度为 550 °C;去溶剂气体体积流量为 1000 L/h;

碰撞气体体积流量为 0.25 mL/h。采用多反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM) 模式进行扫描。各胆汁酸成分的主要质谱检测参数见表 1。

表 1 胆汁酸成分的质谱检测参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of bile acids

序号	胆汁酸成分	定量离子对 ( $m/z$ )	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	$t_R$ /min	内标
1	CA	407.52>69.10	40	35	19.74	CA-d4
2	TCA	514.42>514.42	10	0	10.53	GCA-d4
3	GCA	464.80>74.00	5	30	14.36	GCA-d4
4	CDCA	391.06>391.06	40	0	24.59	DCA-d4
5	TCDC	498.34>80.03	120	50	15.21	GCA-d4
6	GCDCA	448.34>73.76	40	60	20.90	CA-d4

采用“2.1.5”项下色谱方法及“2.1.6”项下质谱方法进行分析。

(2) 线性关系、定量下限 (LLOQ) 和检测下限 (LLOD) 考察: 取“2.1.4”项下质控样品, 加入活性炭, 配制成活性炭质量浓度为 0.053 g/mL 的血浆混悬液, 涡旋 1 h 使其充分接触吸附, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 得到空白基质溶液。精密吸取空白基质 50  $\mu$ L, 制备 6 份, 依次精密加入“2.1.1”项下系列混合对照品溶液 50  $\mu$ L, 甲醇 150  $\mu$ L 和内标混合溶液 50  $\mu$ L, 涡旋 10 s, 振荡 3 min, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min。取上清液 200  $\mu$ L, 氮吹干燥后, 精密加入甲醇 50  $\mu$ L, 充分溶解, 进样测定。以峰面积 ( $y$ ) 为纵坐标, 进样量 ( $x$ ) 为横坐标, 得含基质对照品溶液线性关系。将对照品浓度不断稀释, 测定峰面积, 以信噪比 ( $S/N$ ) = 10 确定为本方法的 LLOQ, 以  $S/N=3$  确定为本方法的 LLOD。

(3) 精密度和重复性考察: 取“2.1.4”项下质控样品, 按照“2.1.3”项下的血浆供试品前处理方法配制低、中、高 3 个浓度样品, 重复进样 6 次, 考察本方法的日内、日间精密度。取“2.1.4”项下质控样品, 制备 6 份, 按照“2.1.3”项下的血浆供试品前处理方法配制低、中、高 3 个浓度样品, 进行测定, 考察方法的重复性。

(4) 加样回收率和基质效应考察: 在低、中、高 3 个浓度下, 将相同体积“2.1.4”项下质控样品进样测定并计算各胆汁酸成分峰面积比值, 得到回收率。

将“2.1.7 (2)”项下的线性关系用含血浆基质的对照品溶液进行分析, 得到标准曲线的斜率, 即  $k_{\text{血浆基质}}$ , 将“2.1.1”项下的系列混合对照品溶液进行分析, 得到标准曲线的斜率, 即  $k_{\text{溶剂}}$ ; 采用回收

## 2.1.7 方法学考察

(1) 专属性考察: 取“2.1.4”项下质控样品, 按照“2.1.3”项下的血浆供试品前处理方法制备,

因子 (recovery factors, RF) 评价基质效应。

$$RF = k_{\text{血浆基质}} / k_{\text{溶剂}}$$

(5) 稳定性考察: 取“2.1.4”项下质控样品, 按照“2.1.3”项下方法分别配制低、中、高浓度样品, 平行制备 6 份。分别于室温下放置 24 h、于 -20 °C 保存 2 个月、连续“冷冻-融化”3 个循环后, 进行分析, 测定血浆中目标成分的实际浓度, 考察样品的短期室温稳定性、长期稳定性及冻融稳定性。

(6) 残留考察<sup>[9]</sup>: 精密吸取“2.1.7 (2)”项下含基质对照品溶液的最高浓度样品进行分析后, 对空白溶剂进行分析, 测定各成分的残留浓度 ( $C_{\text{残留}}$ ), 计算残留率。

$$\text{残留率} = C_{\text{残留}} / \text{LLOQ}$$

2.1.8 含量测定 取各组大鼠血浆, 按照“2.1.3”项方法制备, 测定各组大鼠血浆胆汁酸含量。

2.1.9 统计分析 运用 SPSS 22.0 软件对数据进行正态性检验和方差齐性检验。若两项检验均符合, 则进一步采用单因素方差分析进行统计学处理。组间比较采用 LSD- $t$  检验。

## 2.2 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对胆固醇水平的影响

### 2.2.1 药物制备

(1) 乳香溶液和醋乳香溶液的制备: 各取乳香、醋乳香粉末约 0.5 g, 精密称定, 分别加入 95%乙醇 75 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液减压回收溶剂至干, 残渣用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

(2) ADHBA 溶液的制备: 取 ADHBA 约 4 mg, 精密称定, 以无水乙醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

(3) 乳香+ADHBA 溶液的制备: 取乳香粉末约

0.5 g, 精密称定, 加入 95%乙醇 75 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液减压回收溶剂至干, 得乳香残渣。另取 ADHBA 约 4 mg, 精密称定, 与乳香残渣混合, 用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 即得。

吸取 0.5 mL 10%聚山梨酯 80 的 PBS 溶液于 15 mL 离心管中, 将离心管置于涡旋振荡器上, 开启振荡器, 使溶液始终保持涡旋状态。分别吸取上述各溶液 100  $\mu$ L, 逐滴缓慢加入离心管中, 边涡旋边滴加, 然后各加入 DMEM 培养基至 10 mL 混合均匀后, 用针头滤器除菌, 即得。

**2.2.2 L-02 细胞培养** 复苏 L-02 细胞, 用含 13% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。待细胞融合度为 70%~80%时, 进行消化传代, 培养 3~4 代后用于实验, 实验时采用对数生长期细胞。

**2.2.3 CCK-8 实验** 取处于对数生长期的细胞, 以  $1 \times 10^4$ /孔接种至 96 孔板中, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。弃去培养基, PBS 清洗 2 遍后, 加入不同质量浓度 (5、10、25、50、100、200  $\mu$ g/mL) 醋乳香溶液, 孵育 48 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值。

**2.2.4 ELISA 法检测胆固醇水平** 取处于对数生长期的细胞, 以  $1 \times 10^6$ /孔接种至 6 孔板中, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。设置空白溶剂组、乳香组、醋乳香组、ADHBA 组和乳香+ADHBA 组。用含 0.5%胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿处理 24 h 后, 再分别用“2.2.1”项下制备的含药物溶液的 DMEM 培养基培养 24 h, 取上清, 按 ELISA 试剂盒说明书检测胆固醇含量。

**2.3 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对游离型初级胆汁酸合成酶 CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1 和 CYP7B1 mRNA 表达的影响**

细胞培养方法同“2.2.4”项, 收集细胞待测。取细胞约  $1 \times 10^6$  个, 加入 1 mL 裂解液, 按说明书提取总 RNA, 超微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度。根据反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 根据 SYBR Premix Dimer Eraser 试剂盒说明书进行扩增。CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1、CYP7B1 和 GAPDH 引物序列见表 2。反应体系为 20  $\mu$ L, 反应条件为 94  $^{\circ}$ C、30 s, 94  $^{\circ}$ C、5 s, 55  $^{\circ}$ C、15 s, 72  $^{\circ}$ C、10 s, 共 40 个循环, 以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算 mRNA 表达量。

表 2 CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1、CYP7B1 和 GAPDH 引物序列

Table 2 Primers sequence of CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1, CYP7B1 and GAPDH

引物	序列 (5'-3')
CYP7A1	F: GGAAAACCTCCAACGTATCATG R: GGAAAGACTTTGTGCGAATTGCT
CYP8B1	F: GTATTTGGATACCGTTCAGTGC R: TTTGGACGTCAGCATTACAAAG
CYP27A1	F: AAGGCTGATCCAGAAGTACAAG R: GCCCACTTTCTTATTGGGAAC
CYP7B1	F: ACATACCCATTGAGCTTCTAGG R: AAAAAGTCTGACCATCCTTGC
GAPDH	F: TATGACAACAGCCCTCAAGAT R: AGTCCTTCCACGATACCA

**2.4 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对结合型初级胆汁酸合成酶 BACS、BAAT mRNA 表达的影响**

细胞培养方法同“2.2.4”项, 收集细胞待测。提取总 RNA、反转录 cDNA、扩增方法同“2.3”项。BACS、BAAT 和 GAPDH 引物序列见表 3。

表 3 BACS、BAAT 和 GAPDH 引物序列

Table 3 Primers sequence of BACS, BAAT and GAPDH

引物	序列 (5'-3')
BACS	F: TCCCGAAGCCAGCCATCCTC R: GATCCCAACGACAAGTCCCATCAC
BAAT	F: GGTCTTTGGCTCAGGCGTTGG R: ACCGTGGCTGTGACTTGCTTTAG
GAPDH	F: TATGACAACAGCCCTCAAGAT R: AGTCCTTCCACGATACCA

### 3 结果

**3.1 乳香醋炙前后对 UC 大鼠血浆中初级胆汁酸含量的影响**

**3.1.1 方法学考察结果**

(1) 专属性: 如图 1 所示, 目标成分在相应保留时间处无杂质或其他内源性物质干扰。

(2) 线性关系、LLOQ 和 LLOD: 6 个初级胆汁酸成分的线性方程见表 4,  $r$  为 0.999 0~0.999 6, 表明其在线性范围内线性关系良好, 可以满足血浆中胆汁酸灵敏检测的要求。

(3) 精密度和重复性: 6 个胆汁酸成分的精密度和准确度分别为 1.35%~6.93%、1.32%~5.00%, 均 < 15%<sup>[20]</sup>, 表明该方法的精密度和准确度良好。

(4) 回收率和基质效应: 各成分在低、中、高 3 个浓度下的回收率均为 85.61%~113.86%, RSD 值均低于 15%, 表明回收率结果符合检测要求<sup>[19]</sup>。基质效应结果表明, CA、TCA、GCA、CDCA、TCDC 和 GCDCA 的 RF 值分别为 0.87、1.24、0.92、

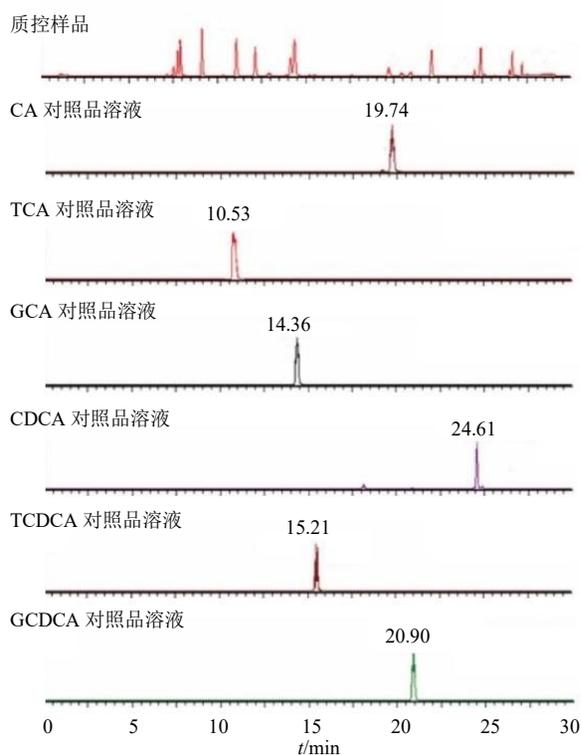


图 1 胆汁酸成分的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of bile acids

1.32、0.87、1.14，基质效应可在接收范围内<sup>[19]</sup>。

(5) 稳定性：质控样品各胆汁酸成分的含量变化为 -14.07%~14.05%，均小于 15%，表明质控样品短期稳定性、长期稳定性及冻融-循环稳定性均符合标准<sup>[20]</sup>。

(6) 残留考察：TCA、TCDCA 和 CA-d4 存在残留，残留率分别为 18.64%、1.65%和 1.45%，符合待测成分残留小于 LLOQ 的 20%，内标成分残留小于 LLOQ 的 5%的标准<sup>[20]</sup>。

3.1.2 UC 大鼠血浆中初级胆汁酸含量测定 如表 5 所示，与正常组相比，模型组大鼠血浆中初级胆汁酸总量以及游离型、结合型初级胆汁酸总量均显著升高 ( $P < 0.01$ )，CA、GCA、CDCA 和 GCDCA 含量显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )，而 TCA 和 TCDCA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。乳香、醋乳香给药后对各胆汁酸表现出扰动作用，两者均对 GCA、CDCA 和 GCDCA 表现出明显的回调作用 ( $P < 0.05, 0.01$ )，醋乳香组对于 CA、CDCA 和 TCDCA、胆汁酸总量以及游离型、结合型初级胆汁酸总量的回调作用更趋近正常组。

表 4 胆汁酸成分线性关系、LLOD 及 LLOQ

Table 4 Linear relationship, LLOD and LLOQ of bile acids

序号	成分	标准曲线	r	线性范围/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LLOD/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LLOQ/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
1	CA	$y=0.01x-12.38$	0.999 5	21.22~2 716.79	0.74	2.81
2	TCA	$y=0.67x-2 052.85$	0.999 2	18.48~2 365.72	0.06	0.19
3	GCA	$y=4.83 \times 10^{-3}x-3.16$	0.999 3	16.28~2 083.33	0.15	0.48
4	CDCA	$y=1.35x+349.41$	0.999 0	19.10~2 445.36	2.43	8.91
5	TCDCA	$y=0.03x-134.78$	0.999 6	16.05~2 055.23	2.17	9.72
6	GCDCA	$y=0.41x-6 653.69$	0.999 3	19.64~2 513.23	0.18	0.35

表 5 大鼠血浆中胆汁酸成分含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Bile acids concentration in rat plasma samples ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
	CA	TCA	GCA	CDCA	TCDCA
正常	1 469.59±183.83	46.20±2.55	78.22±6.40	17.60±1.84	70.02±3.57
模型	4 665.71±417.49 <sup>▲</sup>	20.66±1.05 <sup>▲</sup>	1 124.23±54.45 <sup>▲▲</sup>	84.08±6.49 <sup>▲</sup>	47.81±2.06 <sup>▲</sup>
乳香	8 965.81±826.86 <sup>#</sup>	30.16±2.80	645.39±41.79 <sup>##</sup>	64.46±6.93 <sup>#</sup>	812.23±5.15 <sup>##</sup>
醋乳香	1 528.72±102.91 <sup>###</sup>	25.39±1.55	658.54±44.92 <sup>##</sup>	25.15±1.85 <sup>**</sup>	95.31±8.22 <sup>###</sup>

组别	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )			
	GCDCA	初级胆汁酸总量	游离型初级胆汁酸总量	结合型初级胆汁酸总量
正常	98.86±18.42	1 780.49±216.61	1 487.19±185.67	293.30±30.94
模型	547.95±42.63 <sup>▲▲</sup>	6 490.44±524.17 <sup>▲▲</sup>	4 749.79±423.98 <sup>▲▲</sup>	1 740.65±100.19 <sup>▲▲</sup>
乳香	99.19±4.32 <sup>##</sup>	10 617.24±887.85 <sup>##</sup>	9 030.27±833.79 <sup>##</sup>	1 586.97±54.06
醋乳香	225.34±20.65 <sup>###</sup>	2 558.45±180.1 <sup>###</sup>	1 553.87±104.76 <sup>###</sup>	1 004.58±75.34 <sup>###</sup>

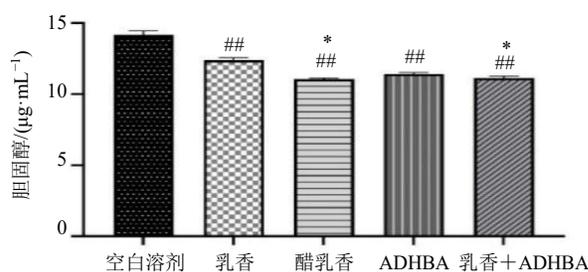
CA、CDCA 为游离型初级胆汁酸 TCA、GCA、TCDCA、GCDCA 为结合型初级胆汁酸 与正常组比较：<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较：<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与乳香组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

CA, CDCA are free primary bile acid TCA, GCA, TCDCA, GCDCA are combined primary bile acid <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs normal group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs *Olibanum* group

### 3.2 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对胆固醇水平的影响

**3.2.1 CCK-8 实验结果** 醋乳香溶液质量浓度  $\geq 25 \mu\text{g/mL}$  时会对 L-02 细胞活力造成显著影响, 故确定醋乳香溶液给药质量浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ 。为保证乳香、ADHBA 和醋乳香用于对比研究给药浓度的平行, 对  $10 \mu\text{g/mL}$  乳香溶液和  $0.05 \mu\text{g/mL}$  的 ADHBA 溶液 ( $10 \mu\text{g/mL}$  醋乳香当量) [21]进行了 CCK8 细胞毒性检测, 结果表明两者对 L-02 细胞活力无显著影响, 故确定乳香、醋乳香和 ADHBA 给药质量浓度分别为 10、10、 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 。

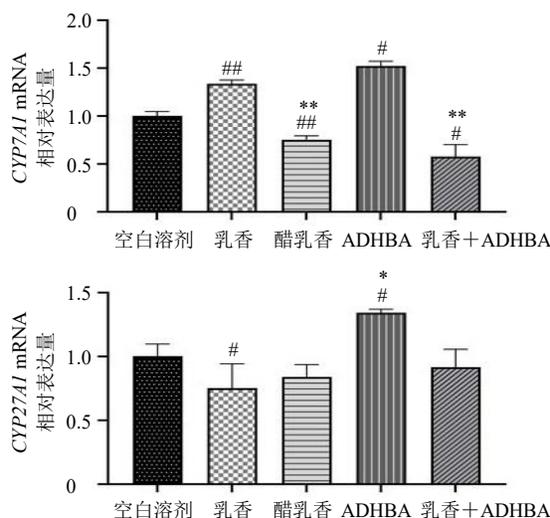
**3.2.2 胆固醇水平测定结果** 如图 2 所示, 各给药



与空白溶剂组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与乳香组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下同  
# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs *Olibanum* group, same below figures

图 2 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对胆固醇水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of *Olibanum* before and after vinegar processed and main difference component ADHBA on cholesterol level ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



组中胆固醇含量均显著低于空白溶剂组 ( $P < 0.01$ ), 可见乳香、醋乳香、ADHBA 和乳香+ADHBA 均能够有效地降低肝脏细胞胆固醇水平。醋乳香组胆固醇含量较乳香组显著减少 ( $P < 0.05$ ), 表明与乳香比较, 醋乳香降低胆固醇效果更强。乳香+ADHBA 组胆固醇含量较乳香组显著减少 ( $P < 0.05$ ), ADHBA 对胆固醇的降低确有作用, 提示其为醋乳香中降低胆固醇水平的关键成分之一。

### 3.3 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对游离型初级胆汁酸合成酶 CYP7A1、CYP8B1、CYP27A1 和 CYP7B1 mRNA 表达的影响

如图 3 所示, *CYP7A1* mRNA 表达结果显示, 与空白溶剂组相比, 乳香、ADHBA 组表达显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 而醋乳香、乳香+ADHBA 组表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 与乳香组相比, 醋乳香、乳香+ADHBA 组表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )。 *CYP8B1* mRNA 表达结果显示, 与空白溶剂组相比, ADHBA 组表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与乳香组相比, 醋乳香、ADHBA 和乳香+ADHBA 组表达均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。 *CYP27A1* mRNA 表达结果显示, 与空白溶剂组相比, 乳香组表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), ADHBA 组表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与乳香组相比, ADHBA 组表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。 *CYP7B1* mRNA 表达结果显示, 与空白溶剂组相比, 乳香、醋乳香、ADHBA 和乳香+ADHBA 组表达均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 与乳香组相比, 醋乳香组表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。

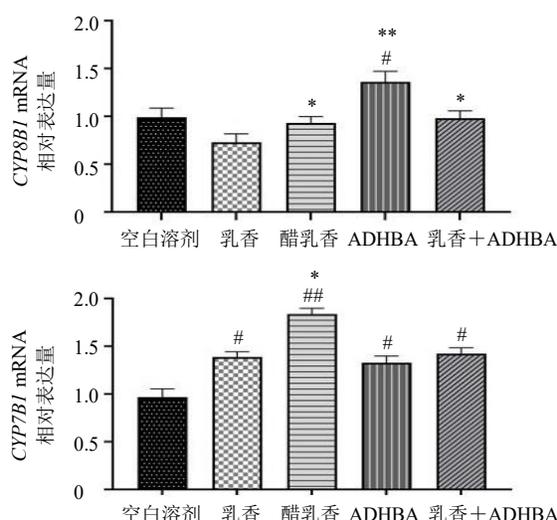


图 3 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对游离型初级胆汁酸合成酶 *CYP7A1*、*CYP8B1*、*CYP27A1* 和 *CYP7B1* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of *Olibanum* before and after vinegar processed and main difference component ADHBA on free primary bile acid synthase *CYP7A1*, *CYP8B1*, *CYP27A1* and *CYP7B1* mRNA expressions ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对结合型初级胆汁酸合成酶 *BACS*、*BAAT* mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与空白溶剂组相比, 乳香组、醋

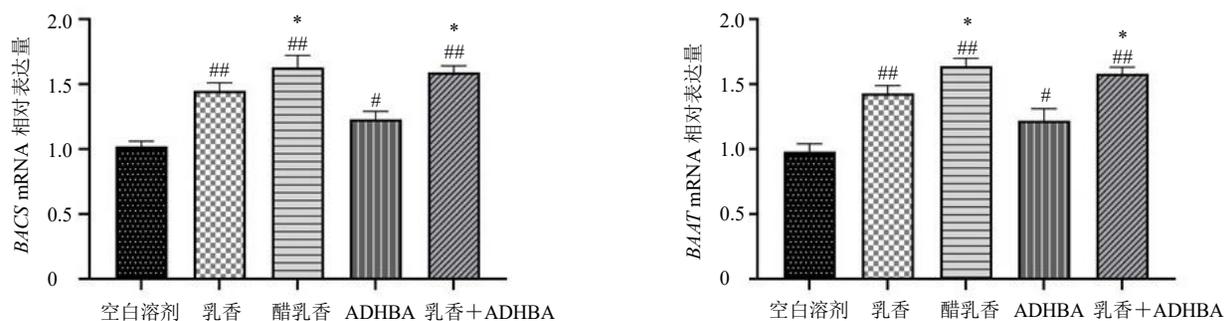


图 4 乳香醋炙前后及主要差异成分 ADHBA 对结合型初级胆汁酸合成酶 *BACS*、*BAAT* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 4 Effect of *Olibanum* before and after vinegar processed and main difference component ADHBA on conjugated primary bile acid synthase *BACS* and *BAAT* mRNA expressions ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 4 讨论

尽管 UC 的发病机制尚不完全清楚, 但随着代谢组学研究的深入, 基于胆汁酸代谢角度对 UC 发病机制进行了探索。研究表明, 相比于正常小鼠, UC 小鼠肝脏中游离型初级胆汁酸和甘氨酸结合型初级胆汁酸含量呈上升趋势, 而牛磺结合型初级胆汁酸含量呈下降趋势<sup>[22]</sup>。临床研究显示, 与正常人群胆汁酸含量比较, UC 患者血液游离型胆汁酸、甘氨酸结合型胆汁酸含量显著升高, 而牛磺结合型胆汁酸含量显著降低<sup>[17]</sup>。本研究结果表明, 与正常大鼠相比, UC 大鼠游离型初级胆汁酸 CA 和 CDCA、甘氨酸结合型初级胆汁酸 GCA 和 GCDCA 含量显著升高, 而牛磺结合型初级胆汁酸 TCA 和 TCDCA 含量显著降低, 与文献报道一致<sup>[22]</sup>。给予乳香和醋乳香进行干预, 发现乳香醋炙后, 对 UC 大鼠血浆中的初级胆汁酸总量和游离型初级胆汁酸、结合型初级胆汁酸总量的回调水平更接近正常组。

中医药通过调节机体胆汁酸信号对 UC 表现出了良好的疗效, 如白头翁汤可通过调控胆汁酸相关信号通路改善 UC<sup>[23]</sup>; 干姜与炮姜干预 UC 的机制可能与胆汁酸合成及调节胆汁酸代谢的相关受体有关<sup>[24]</sup>; 补骨脂可以显著改善 UC 小鼠肠道病理状态和血清细胞因子水平, 其机制可能与调节 CYP7A1 等胆汁酸合成信号通路有关<sup>[25]</sup>。肝脏是初级胆汁酸合成的主要部位, 为探讨乳香醋炙前后及醋炙前后差异成分 ADHBA 对胆汁酸回调作用明显差异的原因, 本研究采用 L-02 正常人体肝细胞, 对比乳香醋

炙前后及醋炙前后差异成分 ADHBA 对胆汁酸合成原料胆固醇以及游离型初级胆汁酸合成酶 *CYP7A1*、*CYP8B1*、*CYP27A1*、*CYP7B1* mRNA 和结合型初级胆汁酸合成酶 *BACS*、*BAAT* mRNA 的干预作用。ADHBA 是乳香醋炙后含量显著增加的主要差异成分, 为了更好地阐明 ADHBA 对初级胆汁酸调控环节的作用, 探究乳香醋炙增效机制, 本研究设立乳香联合 ADHBA 干预组, 使联合体系中 ADHBA 的含量同醋乳香相等, 以明确乳香醋炙增效的物质基础。

本研究结果表明, 乳香和醋乳香均具有降低胆汁酸合成原料胆固醇的作用, 且醋炙后降低作用更强, 主要差异成分 ADHBA 与乳香联合 ADHBA 的调控水平与醋乳香相似。胆汁酸主要通过 2 种途径在肝脏中合成, 经典途径由 CYP7A1 催化胆固醇发生 7 $\alpha$ -羟基化作用, 随后甾核进一步转化并由 CYP8B1 催化侧链发生氧化裂解, 该途径产生的胆汁酸成分约占总胆汁酸的 75%<sup>[18]</sup>; 替代途径由 CYP27A1 催化胆固醇 27-羟基化, 该反应经由 CYP7B1 进一步催化羟基化。经典途径中的 CYP7A1 是胆汁酸合成的限速酶, CYP8B1 消耗或抑制可导致替代途径合成更多胆汁酸<sup>[26]</sup>。本研究结果显示, 乳香及 ADHBA 对于 *CYP7A1* mRNA 表达显示出明显的促进作用, 而对胆固醇表现出明显的降低作用, 表明乳香及 ADHBA 可能主要通过促进 CYP7A1 的表达而加速了胆固醇的消耗, 并表现为游离型初级胆汁酸的增多。乳香醋炙后对初级胆汁

酸合成原料胆固醇的作用, 且醋炙后降低作用更强, 主要差异成分 ADHBA 与乳香联合 ADHBA 的调控水平与醋乳香相似。胆汁酸主要通过 2 种途径在肝脏中合成, 经典途径由 CYP7A1 催化胆固醇发生 7 $\alpha$ -羟基化作用, 随后甾核进一步转化并由 CYP8B1 催化侧链发生氧化裂解, 该途径产生的胆汁酸成分约占总胆汁酸的 75%<sup>[18]</sup>; 替代途径由 CYP27A1 催化胆固醇 27-羟基化, 该反应经由 CYP7B1 进一步催化羟基化。经典途径中的 CYP7A1 是胆汁酸合成的限速酶, CYP8B1 消耗或抑制可导致替代途径合成更多胆汁酸<sup>[26]</sup>。本研究结果显示, 乳香及 ADHBA 对于 *CYP7A1* mRNA 表达显示出明显的促进作用, 而对胆固醇表现出明显的降低作用, 表明乳香及 ADHBA 可能主要通过促进 CYP7A1 的表达而加速了胆固醇的消耗, 并表现为游离型初级胆汁酸的增多。乳香醋炙后对初级胆汁

酸合成回调作用与抑制经典途径限速酶 *CYP7A1* 以及上调 *CYP8B1* mRNA 表达有关,乳香联合 ADHBA 组与醋乳香的调控作用一致。即使醋乳香对胆汁酸合成原料胆固醇水平下调的作用明显,但是研究表明,其对游离型初级胆汁酸合成的过程并没有提升,表明乳香醋炙后对于机体的脂质代谢也有一定的贡献,但是其调控机制还有待进一步深入研究。在肝细胞中,游离型初级胆汁酸通过 BAAT 和 BACS 的作用与甘氨酸和牛磺酸结合形成结合型初级胆汁酸<sup>[18]</sup>,虽然乳香醋炙后对二者的上调作用更强,但是由于醋乳香对游离型初级胆汁酸合成经典途径限速酶 *CYP7A1* 的抑制,导致游离型初级胆汁酸的含量大大降低,使后续结合型初级胆汁酸合成的底物减少,因此,醋乳香干预后,机体结合型初级胆汁酸的总量大大降低。由此可见,游离型初级胆汁酸合成经典途径的限速酶 *CYP7A1* 对乳香醋炙前后在初级胆汁酸调控环节中起到了决定性作用,一方面它决定了游离型初级胆汁酸合成环节,另一方面,该过程的产物是结合型初级胆汁酸合成的底物,同时决定了结合型初级胆汁酸的合成。此外,在初级胆汁酸合成的各个环节中,乳香联合 ADHBA 组表现出与醋乳香相近的作用趋势,提示乳香醋炙前后主要差异成分 ADHBA 可能是发挥调节作用的关键成分之一。ADHBA 在乳香醋炙后含量显著增加,且在细胞层面表现出良好的抗炎活性<sup>[9]</sup>,但基于动物水平 ADHBA 改善 UC 的相关研究,仍有待深入探讨。

本研究从初级胆汁酸合成角度初步阐释了乳香醋炙对 UC 增效的作用机制。采用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-TQ-MS) 技术,探究了乳香醋炙前后对 UC 大鼠血浆胆汁酸的扰动差异。进一步从胆固醇、游离型初级胆汁酸合成和结合型初级胆汁酸合成 3 个关键环节,初步阐释了乳香醋炙增效机理。UC 不仅与初级胆汁酸关系密切,而且也受到次级胆汁酸的影响。次级胆汁酸是初级胆汁酸进入肠道后,在肠道菌群作用下经过脱羟基、络合反应等生成的胆汁酸。在人类研究和动物模型中,次级胆汁酸与肠道疾病和肝脏疾病也有密切的联系<sup>[27-28]</sup>,关于乳香醋炙前后如何介导次级胆汁酸调节 UC 的作用机制,仍需要进一步的研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 沈洪. 溃疡性结肠炎: 中西医的过去、现在与未来 [M].

南京: 东南大学出版社, 2012: 3.

- [2] 沈洪, 唐志鹏, 唐旭东, 等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南 (基层医生版) [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4155-4160.
- [3] 周青, 吴本升, 商洪涛, 等. 具有研发前景的治疗炎症性肠病的中草药述评 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(4): 764-768.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 233.
- [5] 李继成, 余振喜, 杨丽嘉. 齿叶乳香树脂对慢性结肠炎的疗效 [J]. 国外医药 (植物药分册), 2002, 17(4): 167.
- [6] Gupta I, Parihar A, Malhotra P, et al. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis [J]. *Eur J Med Res*, 1997, 2(1): 37-43.
- [7] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 208.
- [8] 梁东蕊, 宋志前, 宁张弛, 等. 乳香与醋乳香对溃疡性结肠炎大鼠抗炎作用的对比研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(1): 101-107.
- [9] Ning Z, Wang C, Liu Y, et al. Integrating strategies of herbal metabolomics, network pharmacology, and experiment validation to investigate frankincense processing effects [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1482.
- [10] 宁张弛, 宋志前, 刘元艳, 等. 不同提取方式对醋乳香中主要乳香酸类成分含量及其抗炎活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 14-19.
- [11] 宁张弛, 宋志前, 王淳, 等. 炮制温度和时间对醋乳香外观颜色及 6 种乳香酸含量的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(3): 508-515.
- [12] 董运茁, 张弋, 刘振丽, 等. 乳香醋炙前后 13 种乳香酸成分含量变化及活性比较研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7128-7137.
- [13] Ning Z, Liu Z, Song Z, et al. Application of a strategy based on metabolomics guided promoting blood circulation bioactivity compounds screening of vinegar [J]. *Chem Cent J*, 2017, 11(1): 38.
- [14] Liang D R, Ning Z C, Song Z Q, et al. The effects of vinegar processing on the changes in the physical properties of frankincense related to the absorption of the main boswellic acids [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3453.
- [15] Bennet J D. Ulcerative colitis: The result of an altered bacterial metabolism of bile acids or cholesterol [J]. *Med Hypotheses*, 1986, 20(2): 125-132.
- [16] Kühn T, Stepien M, López-Nogueroles M, et al. Prediagnostic plasma bile acid levels and colon cancer risk: A prospective study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(5): 516-524.
- [17] Gnewuch C, Liebisch G, Langmann T, et al. Serum bile acid profiling reflects enterohepatic detoxification state

- and intestinal barrier function in inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(25): 3134-3141.
- [18] Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2): 111-128.
- [19] Nandania J, Peddinti G, Pessia A, *et al.* Validation and automation of a high-throughput multi-targeted method for semi-quantification of endogenous metabolites from different biological matrices using tandem mass spectrometry [J]. *Metabolites*, 2018, 8(3): 44.
- [20] Zimmer D. New US FDA draft guidance on bioanalytical method validation versus current FDA and EMA guidelines: Chromatographic methods and ISR [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(1): 13-19.
- [21] 宁张弛. 基于乳香酸成分变化探索乳香醋炙抗炎活性增强的机理研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [22] 亓云鹏, 张天, 王仁萍, 等. 雷公藤红素对炎症性肠病小鼠血清中胆汁酸代谢谱的影响 [J]. *药学服务与研究*, 2018, 18(6): 429-433.
- [23] Hua Y L, Jia Y Q, Zhang X S, *et al.* Baitouweng Tang ameliorates DSS-induced ulcerative colitis through the regulation of the gut microbiota and bile acids via pathways involving FXR and TGR5 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111320.
- [24] 陈琛. 基于代谢组学方法的干姜和炮姜活性组分对溃疡性结肠炎干预作用的研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [25] 周植星. 补骨脂治疗溃疡性结肠炎活性物质筛选及机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2020.
- [26] Jia W, Wei M, Rajani C, *et al.* Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(5): 411-425.
- [27] Sinha S R, Haileselassie Y, Nguyen L P, *et al.* Dysbiosis-induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(4): 659-670.
- [28] Li M, Cai S Y, Boyer J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56: 45-53.

[责任编辑 李亚楠]