

基于代谢组学和肠道菌群研究雷公藤红素抗高尿酸血症肾病的作用机制

曲木达尔木¹, 麦仙燕¹, 姜千乐¹, 穆卡然·艾买江², 李姮樨¹, 邵晓妮^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要: **目的** 基于代谢组学和肠道菌群多维度整合研究雷公藤红素 (celastrol, CEL) 抗高尿酸血症肾病 (hyperuricemic nephropathy, HN) 的作用机制。 **方法** 腺嘌呤联合乙醇胺构建 HN 小鼠模型, 设对照组、模型组、非布司他 (febuxostat group, FG) 组和 CEL 高、中、低剂量 (2.0、1.0、0.5 mg/kg) 组, ig 给药 14 d 后, 检测小鼠血清尿酸 (uric acid, UA)、尿素氮 (urea nitrogen, UREA) 及肌酐 (creatinine, CREA) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肾组织病理变化; 收集小鼠粪便, 采用 16S rDNA 高通量测序法检测肠道菌群变化, 采用超高压液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术检测粪便内源性代谢物水平, 结合主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析对差异代谢物进行筛选和鉴定, 进而利用 MetaAnalyst 数据库进行代谢通路分析, 并进行肠道菌群和差异代谢物相关性分析。 **结果** 各剂量 CEL 均可降低 HN 小鼠的血清 UA 水平, 其中, 高剂量 CEL 可显著降低 HN 小鼠的血清 UREA、CREA 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 具有较好的肾保护作用, 可改善肾组织病理损伤; 共鉴定出 45 个差异代谢物, 涉及 6 条关键代谢通路, 提示 CEL 可能通过调节谷氨酰胺、亚油酸代谢、谷氨酸代谢、嘧啶代谢、组氨酸代谢、磷酸戊糖途径和精氨酸生物合成发挥作用; CEL 各剂量组菌群结构有向对照组恢复的趋势, 其中乳酸菌属、螺杆菌属、另枝菌属、葡萄球菌属、拟普雷沃氏菌属及拟杆菌属发生显著变化。 **结论** CEL 可能通过影响氨基酸、能量及脂质等代谢通路并调控肠道菌群结构, 而发挥治疗 HN 作用。

关键词: 雷公藤红素; 高尿酸血症肾病; 肠道菌群; 代谢组学; 16S rDNA 测序

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6607-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.015

Mechanism of celastrol against hyperuricemic nephropathy based on metabolomics and intestinal flora

QUMU Daermu¹, MAI Xianyan¹, JIANG Qianle¹, MUKARAM Amatjan², LI Hengxi¹, SHAO Xiaoni¹

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of celastrol (CEL) on hyperuricemic nephropathy (HN) based on multi-dimensional strategy of metabolomics and integration of intestinal flora. **Methods** Adenine combined with ethylamine butanol intragastric administered mice were used as research objects. Control group, model group, febuxostat group, CEL high-, medium- and low-dose (2.0, 1.0, 0.5 mg/kg) groups were established. After 14 d of corresponding drug treatment, serum uric acid (UA), urea nitrogen (UREA) and creatinine (CREA) levels in each group were detected. Hematoxylin-eosin staining was used to observe pathological changes in kidney tissue. Changes in the intestinal flora of mice were detected by high throughput 16S rDNA sequencing technology. Ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry technology was used to detect level of fecal endogenous metabolites in mice, and principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were used to screen and identify differential metabolites. MetaAnalyst platform was used for metabolic pathway analysis, while correlation analysis of intestinal microflora and differentiated metabolites was constructed. **Results** All doses of CEL can effectively reduce serum UA levels in HN mice. Notably, high-dose of CEL can significantly reduce serum UREA and CREA levels ($P < 0.01$, 0.001),

收稿日期: 2024-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81801086); 四川省自然科学基金项目 (2022NSFSC1574); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金优秀培养工程项目 (2023NYXSS078)

作者简介: 曲木达尔木, 硕士研究生, 从事中药及复方药效研究。E-mail: 2339463459@qq.com

*通信作者: 邵晓妮, 副教授, 硕士生导师, 从事中药及复方药效研究。E-mail: xnshao@swun.edu.cn

demonstrating significant renal protection and improvement in renal tissue pathological damage. A total of 45 potential biomarkers were identified, and a total of six pathways are closely related to HN. CEL was closely associated with alterations in glutamine, linoleic acid metabolism, glutamate metabolism, pyrimidine metabolism, histidine metabolism, pentose phosphate pathway, and arginine biosynthesis. The microflora of each CEL dose group had a tendency to recover from that of the control group, in which *Lactobacillus*, *Helicobacter*, *Alistipes*, *Staphylococcus*, *Alloprevotella* and *Bacteroides* had significant changes. **Conclusion** CEL can modify metabolic pathways such as amino acids, energy, and lipids, and it can also regulate the structure of intestinal flora, thereby playing a role in the treatment of HN.

Key words: celastrol; hyperuricemic nephropathy; intestinal flora; metabolomics; 16S rDNA sequencing

高尿酸血症肾病 (hyperuricemic nephropathy, HN) 是高尿酸血症的常见并发症, 主要由于体内尿酸 (uric acid, UA) 堆积过多或排泄不足所致^[1]。HN 的特征为尿酸盐沉积和肾小管间质纤维化, 并最终逐渐发展为终末期肾病^[2]。目前临床上可用于治疗 HN 的主要药物包括黄嘌呤氧化酶抑制剂、尿酸转运蛋白 1 抑制剂和重组尿酸氧化酶补充剂等, 但其不良反应多, 容易引起胃肠道反应, 并且会诱发结石, 不适用于肾结石患者^[3]。因此, 寻找新的治疗 HN 药物是临床亟待解决的问题。

雷公藤红素 (celastrol, CEL) 是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根皮中分离出的具有多种生物活性的化合物, 具有祛风除湿和消肿止痛的功效^[10]。研究表明, CEL 具有免疫抑制、抗炎、抗氧化应激、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和自噬的作用, 可用于抗肿瘤、抗类风湿性关节炎、抗神经退行性疾病和抗糖尿病肾病等^[4-7]。研究发现, CEL 可通过上调肾小球内皮细胞和足细胞来减轻肾组织纤维化, 用于改善慢性肾功能障碍^[8]。此外, CEL 在治疗急性肾损伤中也具有显著作用, 可通过抑制核转录因子下游炎症信号通路和改善线粒体功能降低肾毒性^[9], 也可通过上调核因子 E2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4, 减轻脂质过氧化、铁质富集和铁死亡改善肾功能^[10]。高尿酸血症导致尿酸盐晶体的形成后, 刺激巨噬细胞活化, 导致 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 的激活, 最终导致白细胞介素-1 β 和白细胞介素-18 的产生和释放, 可介导炎症和细胞凋亡, 引起炎症级联反应。肾脏是最常见的高尿酸血症受累器官之一, UA 通过损害肾内皮细胞, 激活肾素血管紧张素系统和促进炎症反应来诱发 HN^[11]。然而, CEL 治疗 HN 的确切机制尚不清楚^[12], 其潜在靶点及药理学作用机制有待进一步阐明。

HN 的发生和发展涉及多个器官调控, 是复杂的生物过程。肠道菌群及其代谢物通过“肠-肾轴”

影响宿主肾脏功能, 肠道菌群紊乱会导致肾功能损伤的发生, 肠道菌群及代谢调控已成为治疗代谢性疾病诱发的肾功能损伤及药物研发的新靶点^[13-18]。研究表明, CEL 可诱导高脂饮食小鼠的肠道脂质排泄量增加和肠道菌群组成发生变化, 证实了 CEL 可通过调节肠道菌群和肠道脂质吸收来实现减肥效果^[19]。此外, CEL 还被证实可通过调节肠道菌群结构维持溃疡性结肠炎的免疫平衡和抑制原发性肝癌的细胞增殖^[20], 但 CEL 对 HN 小鼠肠道菌群的影响尚未见文献报道。

本研究整合肠道菌群和代谢组学, 探讨 CEL 治疗腺嘌呤联合乙胺丁醇诱导的 HN 小鼠模型的潜在作用机制; 基于超高压液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术, 结合多元统计分析筛选鉴定 CEL 治疗后 HN 小鼠的生物标志物及代谢通路; 利用 16S rDNA 高通量测序技术分析肠道菌群属水平组成及相对丰度的变化, 并筛选各组间的差异菌群; 最后, 通过相关性分析探究肠道菌群与代谢产物的关系, 探究 CEL 治疗 HN 的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

CEL (质量分数 98%, 批号 C2218431)、腺嘌呤 (批号 D2102060)、DMSO (批号 H2120207) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 非布司他 (febuxostat group, FG, 国药准字号 H20130058, 批号 62109765) 购自江苏万邦生化医药集团有限责任公司; 盐酸乙胺丁醇 (国药准字号 H51020917, 批号 H51020917) 购自成都锦华药业有限公司; 聚山梨酯-80 (批号 0500114740) 购自成都长荣化工有限公司; 甲醇 (批号 144282)、乙腈 (批号 1499230-935) 均购自德国 Merck 公司; 血清 UA 试剂盒 (批号 57121601)、血清尿素氮 (urea nitrogen, UREA) 试剂盒 (批号 58266201)、血清肌酐 (creatinine, CREA) 试剂盒 (批号 53476702) 均购自瑞士 Roche 公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色套装 (批号 G1003)

购自武汉赛维尔生物科技有限公司；粪便基因组 DNA 提取试剂盒（批号 D4300）购自美国 Zymo Research 公司；AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒（批号 AP-GX-50）购自美国 Axygen 公司；NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep 试剂盒（批号 NEB-E7645S）购自美国 Illumina 公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 36 只，6~8 周龄，体重（20±2）g，由成都达硕实验动物研究中心提供，动物许可证号 SCXK（川）2021-036。动物饲养于温度 22℃、相对湿度（55±5）%、每 12 h 昼夜间断性照明的环境下，期间自由进食饮水，适应性饲养 1 周。动物实验方案均经西南民族大学动物伦理委员会审核批准（批准号 2023MDLS072）。

1.3 仪器

H1850R 型高速冷冻离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）；VORTEX-5 型涡旋混合器（海门 Kyllin-Bell 公司）；真空离心浓缩仪（德国 Eppendorf 公司）；Cobas C311 型全自动血生化仪（瑞士 Roche 公司）；Vanquish Flex UHPLC 超高效液相色谱仪、Q Exactive 台式四极杆-轨道阱高分辨质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；RM2016 型病理切片机（德国 Leica 公司）；JB-P5 型包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；Eclipse E100 型显微镜（日本 Nikon 公司）；QuantiFluor™-ST 微型荧光计（美国 Promega 公司）；Illumina Miseq 高通量测序仪（美国 Illumina 公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药

BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、FG（5 mg/kg，相当于临床等效剂量）组和 CEL 高、中、低剂量（2.0、1.0、0.5 mg/kg）组^[21]，每组 6 只。对照组 ig 等体积生理盐水，其余各组 ig 以生理盐水配制成的 1%腺嘌呤和 2.5%盐酸乙胺丁醇混悬液（10 mL/kg），1 次/d，连续 20 d。在造模第 6 天对各给药组进行 ig 给药，同时对照组和模型组 ig 等体积生理盐水，1 次/d，连续 14 d。

2.2 血清 UA、UREA 和 CREA 水平的测定

给药结束后，小鼠禁食 12 h，采用眼球摘除法取血，在室温下静置 30 min，并在低温下 3 500 r/min 离心 15 min。取上层血清，使用全自动生化仪检测各组小鼠血清中 UA、UREA 和 CREA 水平。

2.3 肾组织病理学观察

取小鼠肾组织固定于 4%的多聚甲醛中，置于梯度乙醇中脱水，然后用二甲苯洗涤，石蜡包埋切片后，进行 HE 染色，于显微镜下观察肾脏组织病理变化并拍照。

2.4 16S rDNA 测序分析

在无菌条件下取小鼠肠道粪便，并采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，检测纯度和浓度。采用 DNA 条形码和高保真 DNA 聚合酶特异性引物对选定的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增，PCR 产物采用 2%琼脂糖凝胶电泳分析，并采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行凝胶切割回收。引物序列：上游引物 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'，下游引物 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'。PCR 扩增回收产物经微型荧光计对电泳初步定量结果进行检测和定量，并根据每个样品所需测序量按适当比例混合。

文库构建使用 NEB Next®Ultra™ DNA Library Prep 试剂盒，构建的文库使用连接到 Qubit 的安捷伦 2100 型生物分析仪进行质量测试，随后在 Illumina Miseq 测序平台进行高通量测序。数据按照 97%的相似性阈值将序列划分为不同的运算分类单元（operational taxonomic units, OTU），并在质量测试后使用 QIIME2 软件对文库进行测序，实现各样本在属水平上的组成分布可视化。序列分析利用 UPARSE 软件，采用 UPARSE-OTU 和 UPARSE-OTUref 算法进行 α -多样性分析和 β -多样性分析^[22]。测算 Chao1 物种丰度、主成分分析（principal component analysis, PCA）和主坐标分析（principal co-ordinates analysis, PCoA）3 个指标。LEfSe 用于量化不同组内的生物标志物。

2.5 粪便代谢组学分析

2.5.1 粪便样本制备 各组小鼠粪便在 4℃缓慢解冻，真空干燥后，将预冷的含有内标 400 μ L 70%甲醇水溶液加入到 20 mg 样品中，涡旋，使样品在低温中超声处理 30 min，静置 10 min 后，4℃、14 000×g 离心 20 min，除去沉淀物，将上清液于 4℃、14 000×g 离心 15 min。转移 200 μ L 上清液，用于后续分析。

2.5.2 色谱-质谱分析条件

（1）色谱条件：柱温 30℃；体积流量 0.3 mL/min；进样量 2 μ L；流动相为含 25 mmol/L 乙酸铵、25 mmol/L 氨水的水溶液（A）-乙腈（B）；梯

度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65%~40% B; 8~9 min, 40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B。整个分析过程中样品置于 4 °C 自动进样器中。

(2) 质谱条件: 分别采用电喷雾电离 (ESI) 正离子和负离子模式进行检测, 雾化气辅助加热气 1 (Gas1) 压力 60 psi (1 psi=6.895 kPa); 辅助加热气 2 (Gas2) 压力 60 psi; 气帘气 (CUR) 压力 30 psi; 离子源温度 600 °C; 喷雾电压 (ISVF) $\pm 5\ 500\text{ V}$; 一级质荷比检测范围 $m/z\ 60\sim 1\ 000$, 二级离子质荷比检测范围 $m/z\ 25\sim 1\ 000$; 一级质谱扫描累积时间 0.20 s, 二级质谱扫描累积时间 0.05 s; 二级质谱采用数据依赖型采集模式 (IDA) 获得, 并且采用峰强度值筛选模式, 去簇电压 (DP) $\pm 60\text{ V}$, 碰撞能量 (35 ± 15) eV, IDA 设置如下: 动态排除同位素离子范围 $m/z\ 4$, 每次扫描采集 10 个碎片图谱。

2.5.3 代谢组学数据处理与分析 通过 Analyst IF 1.7 软件处理检测数据, 将总体峰强度归一化后, 基于自建数据库, 根据检测物质的保留时间、子母离子对信息及二级谱数据进行定性分析得到初步结果, 处理后的数据采用 R 软件包进行分析。采用 PCA 对数据进行建模分析, 评估样品的分布情况; 通过正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA) 对组间分类贡献较大的变量, 利用投影变量重要性 (variable importance for the projection, VIP) > 1 及独立 t 检验 $P < 0.05$ 的条件筛选显著差异代谢物。利用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg>) 和 MetaAnalyst 数据库 (<http://www.metaanalyst.ca>) 进行代谢通路途径富集。

2.6 统计学分析

数据采用 GraphPad Instat 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采取单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较和 Tukey 事后检验 (Tukey's post hoc test)。

3 结果

3.1 CEL 对 HN 小鼠血清 UA、UREA、CREA 水平以及肾组织病理变化的影响

如图 1-A~C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的 UA、UREA 和 CREA 水平显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明 HN 模型构建成功。与

模型组比较, CEL 高、中、低剂量组小鼠血清 UA 水平均有降低, 其中低、高剂量 CEL 可显著降低 HN 小鼠血清 UREA、CREA 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且具有较好的肾保护作用。

如图 1-D 所示, 对照组小鼠肾组织包膜形态结构完整, 间质未见充血或炎症细胞浸润、坏死、变性或纤维化。模型组小鼠肾组织基底膜增厚, 病变区间质有大量纤维组织增生及明显炎症细胞浸润, 且肾小管表现为粗大空泡样变性。CEL 各剂量组小鼠肾组织病变程度均减轻, 病变区域基底膜增厚、局部间充质细胞浸润、纤维组织增生情况有不同程度的改善。

3.2 CEL 对 HN 小鼠肠道菌群的影响

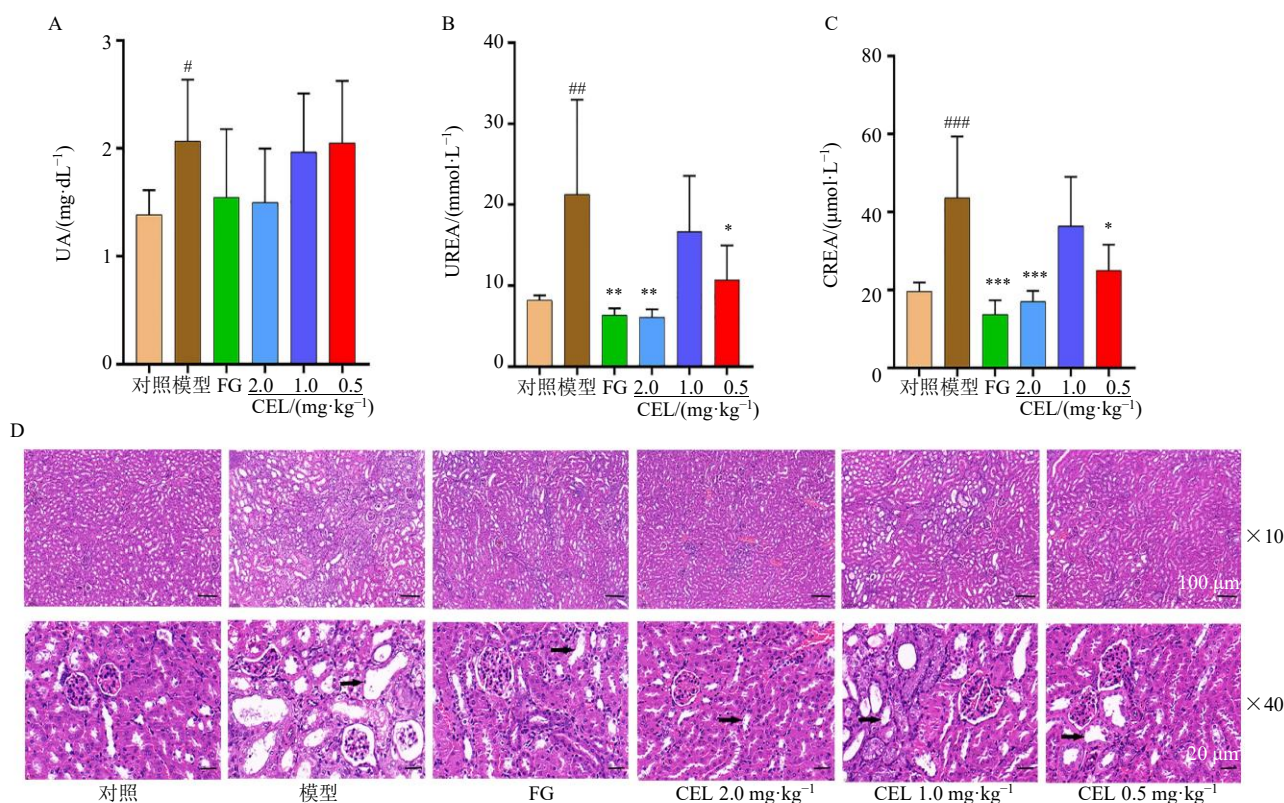
3.2.1 肠道菌群多样性分析 如图 2-A 所示, 6 组中共有 607 个共同 OTU。如图 2-B、C 所示, 根据物种标注结果, 在门、属水平上进行种级聚类, 用各样本物种相对丰度表示。如图 2-D 所示, Rarefaction 曲线用于反映样品物种的丰度, 曲线趋于平缓, 说明测序数据量合理。如图 2-E 所示, 各组的 Shannon 曲线趋于平稳, 表明测序数据量可传递样品的大部分微生物信息。如图 2-F 所示, Rank-abundance 曲线反映了样本物种的均匀性。如图 2-G~I 所示, 箱形图显示了 α -多样性分析中类群内物种多样性的离散度。如图 2-J~L 所示, β -多样性分析表明种群间物种多样性存在差异。以上结果表明, 模型组和给药组之间肠道菌群组成存在差异。

3.2.2 肠道差异菌群分析 方差分析结果 $R = 0.177$, $P = 0.001$, 表明组间差异显著。如图 3 所示, 在属水平上, CEL 各组富集拟普雷沃氏菌属和普雷沃菌科_UCG_001, 模型组富集螺杆菌属、杜氏菌属和栖粪杆菌属, FG 组富集埃扎基拉菌。

如图 4 所示, 在门水平上, 疣微菌门、蓝菌门、软壁菌门、脱铁杆菌门、放线菌门、变形菌门、髌骨细菌门、 ϵ -变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门存在差异。在属水平上, 螺杆菌属、拟普雷沃菌属、普雷沃菌科_UCG_001、厌氧棒状菌属、真/优杆菌属、GCA_900066575、肠单胞菌属、颤杆菌属、理研菌属和瘤胃球菌属-1 存在差异。

3.3 CEL 对 HN 小鼠粪便代谢组学的影响

3.3.1 多元统计分析 如图 5 所示, 在正、负离子模式下, 质控样本均聚集良好, 说明系统稳定, 数据可靠。各组样本在 95% 的置信区间内均可以较好地聚为一类, 且各组之间有明显的离散。



A-血清 UA 水平; B-血清 UREA 水平; C-血清 CREA 水平; D-肾组织病理变化, 箭头指向肾小管病变, 表现为粗大空泡样变性; 与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

A-serum UA level; B-serum UREA level; C-serum CREA level; D-pathological changes of kidneys, arrows represent macrovacuolar degeneration of renal tubules; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 1 血清 UA、UREA、CREA 及肾组织病理分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

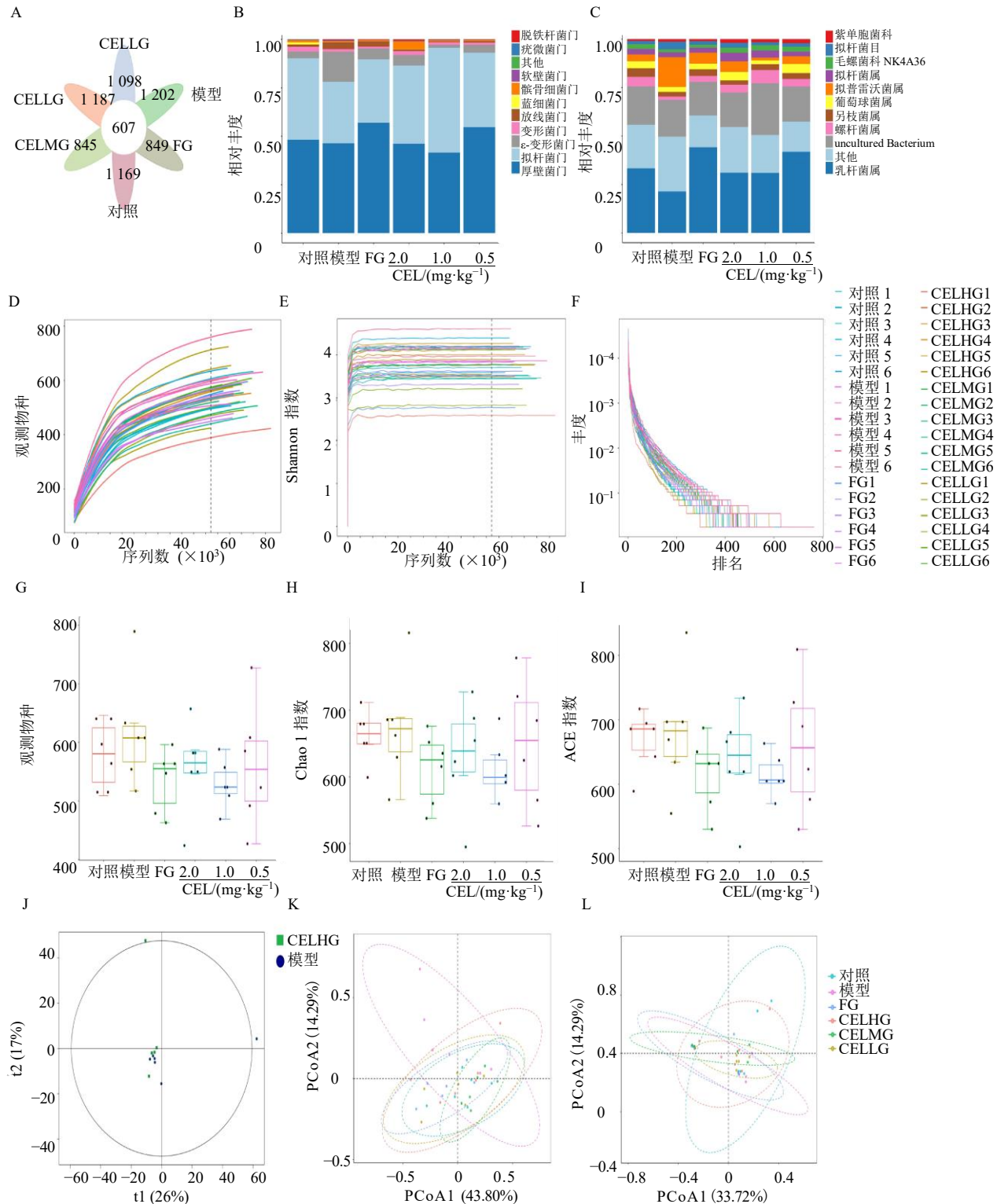
Fig. 1 Levels of UA, UREA and CREA in serum and pathological analysis of kidney tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

如图 6-A、C 所示, PLS-DA 显示, 在正、负离子模式下, CEL 高剂量组和模型组样本之间显著分开。为进一步研究 HN 小鼠在给予 CEL 后内源性代谢物的变化, 进行 OPLS-DA, 见图 6-B、D。如图 6-E、F 所示, 在正离子模型中, PLS-DA 模型参数为 $R^2_Y = 0.964$ 、 $Q^2 = 0.44$, OPLS-DA 模型参数为 $R^2_Y = 0.961$ 、 $Q^2 = -0.093$ 。如图 6-G、H 所示, 在负离子模型中, PLS-DA 模型参数为 $R^2_Y = 0.997$ 、 $Q^2 = 0.460$, OPLS-DA 模型参数为 $R^2_Y = 0.971$ 、 $Q^2 = 0.052$ 。置换检验分析表明模型具有较高的解释率及预测率。

3.3.2 差异代谢物分析 正、负离子模式下, 根据各组不同代谢物的分层聚类分析, 筛选出具有显著性差异的 10 种代谢物, 包括胞嘧啶、4-吡啶酸、4-咪唑乙酸酸盐、6-甲氧基苯并恶唑啉-2(3H)-1、2'-脱氧肌苷、丁酸、21-羟基孕烯醇酮、亚油酸、异戊烯腺嘌呤、组氨酸-丝氨酸 (图 7)。如表 1 所示, 通过对各组之间代谢物富集, 共得到 45 个差异代谢物及其变化趋势, 其

中正离子模式 23 个, 负离子模式 22 个。

3.3.3 代谢通路分析 通过对代谢物富集分析, 筛选出 6 条潜在的差异代谢通路 (图 8-A), 分别为亚油酸代谢、谷氨酸和谷氨酰胺代谢、嘧啶代谢、组氨酸代谢、磷酸戊糖途径、精氨酸生物合成途径, 表明 CEL 可能通过调节氨基酸代谢、亚油酸代谢、嘧啶代谢等途径发挥改善肾功能的作用。其中, 大多数代谢途径都与肠道微生物代谢有关, 表明 HN 小鼠的肠道微生物群存在失调状态。此外, 菌群失调还与嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、精氨酸代谢、脯氨酸代谢、丙氨酸代谢、天冬氨酸代谢和谷氨酸代谢以及精氨酸的生物合成有关。KEGG 通路富集分析采用 Fisher 精确检验, 计算并分析各通路代谢物富集的显著性差异 (图 8-B)。如图 9 所示, 本研究根据差异代谢物的生物功能将差异代谢物的相互作用网络分为嘧啶代谢 (胞嘧啶、脱氧尿嘧啶)、组氨酸代谢、谷氨酰胺和谷氨酸代谢、亚油酸代谢。



A-OTU 图; B、C-各样本物种相对丰度图; D-Rarefaction 曲线; E-Shannon 指数; F-Rank-abundance 曲线; G~I- α -多样性指数; J~L- β -多样性指数; CELHG-CEL 高剂量 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, CELMG-CEL 中剂量 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, CELLG-CEL 低剂量 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 图 4~6 同。

A-OTUs; B, C-relative abundance of species; D-Rarefaction curves; E-Shannon index; F-Rank-abundance curves; G-I- α -diversity index; J-L- β -diversity index; CELHG-high-dose of CEL group ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CELMG-medium-dose of CEL group ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CELLG-low-dose of CEL group ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), same as Figs. 4~6.

图 2 肠道菌群丰度分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Abundance analysis of gut microbiota ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

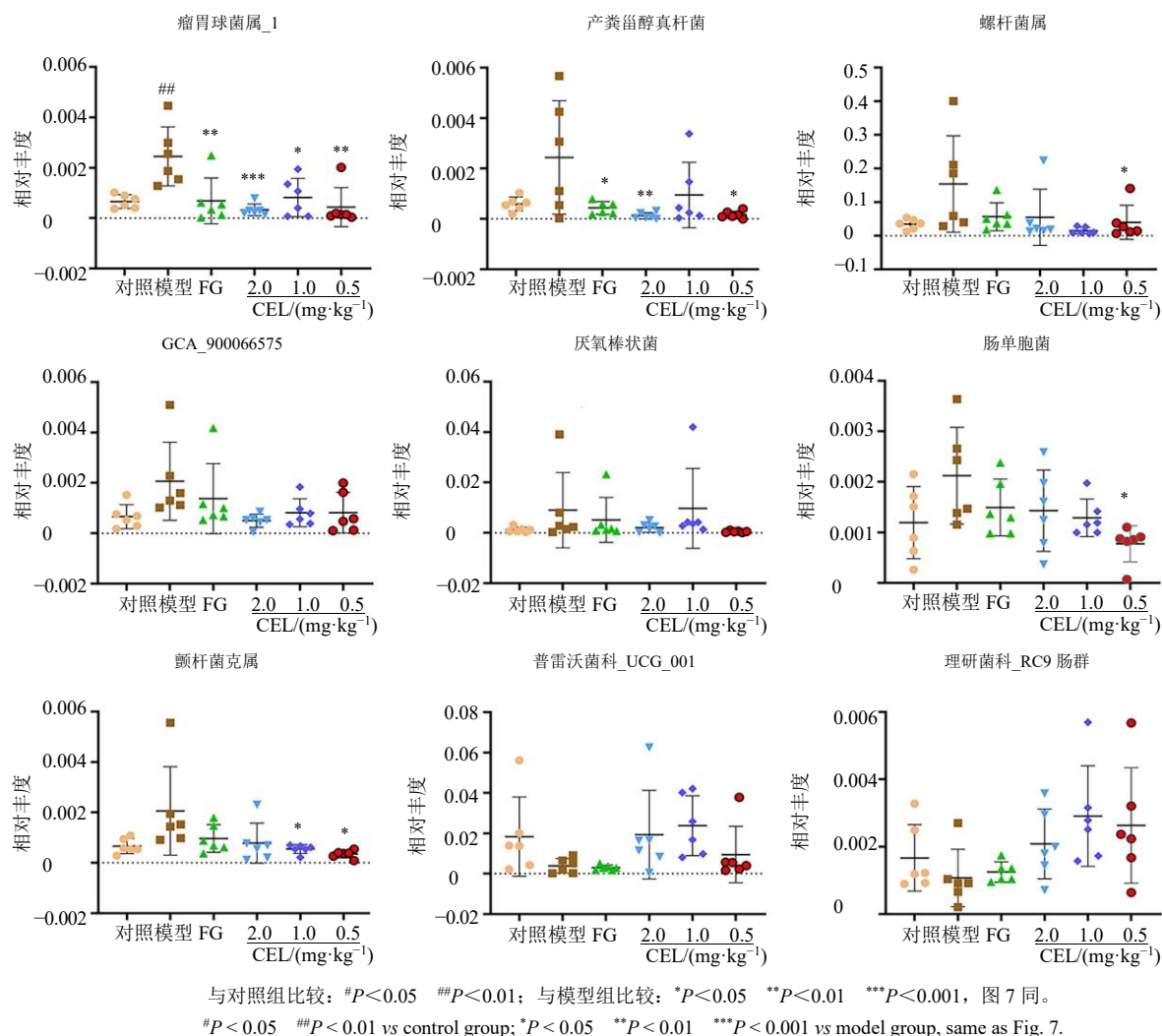


图 3 肠道菌群多样性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Diversity analysis of gut microbiota ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 粪便差异代谢物与差异菌群的相关性分析

本研究分析了粪便肠道菌群和代谢组学之间的相关性,通过 16S rDNA 扩增子测序和非靶向代谢组学分析,获得在属水平上的 27 个显著差异菌群 (LEfSe LDA>2、 $P < 0.05$) 和 81 个显著差异代谢物 (VIP>1、 $P < 0.05$)。通过对菌群和代谢物进行 Spearman 相关分层聚类分析,探讨了差异菌群和代谢物的相关性,并使用 R 3.4.2 Heatmap 软件包进行绘图。如图 10 所示,副球菌属、拟普雷沃菌属、厌氧支原体属、普雷沃菌科-UCG-001、产粪甾醇真杆菌、瘤胃球菌属-1、嗜木聚糖真杆菌、红蜡菌科-UCG_002、GCA_900066575、杜氏菌属和瘤胃梭菌属-6 与粪便代谢物显著相关 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

4 讨论

HN 是一种由于体内 UA 浓度过高,UA 结晶堆

积在肾小球内部,导致肾小球滤过功能受损,表现为蛋白尿、血尿等症状,且结晶沉积在肾间质,引起间质炎症反应,导致慢性肾脏炎症和纤维化,严重影响肾脏功能^[23]。前期大量研究结果表明,中药单体及中药复方可降低 UA 水平,从而减轻高尿酸状态下的肾组织炎症及损伤,延缓 HN 的病情发展进程^[24]。虽然大量动物、细胞实验证实中药的活性成分在改善 HN 方面具有独特优势,但是中药靶向 HN 的新药开发研究缺乏深层次的探索^[25]。“肠-肾轴”是肠道菌群和肾脏组织之间的双向通讯途径,肠道菌群及其代谢物通过“肠-肾轴”影响宿主肾功能,肠道菌群紊乱会导致肾功能损伤的发生^[26]。肠道菌群已成为治疗肾脏疾病及药物研发的新靶点^[27];代谢组学可以精准分析生物体系功能水平和代谢物的变化,采用代谢组学对代谢物的可量化差异进行

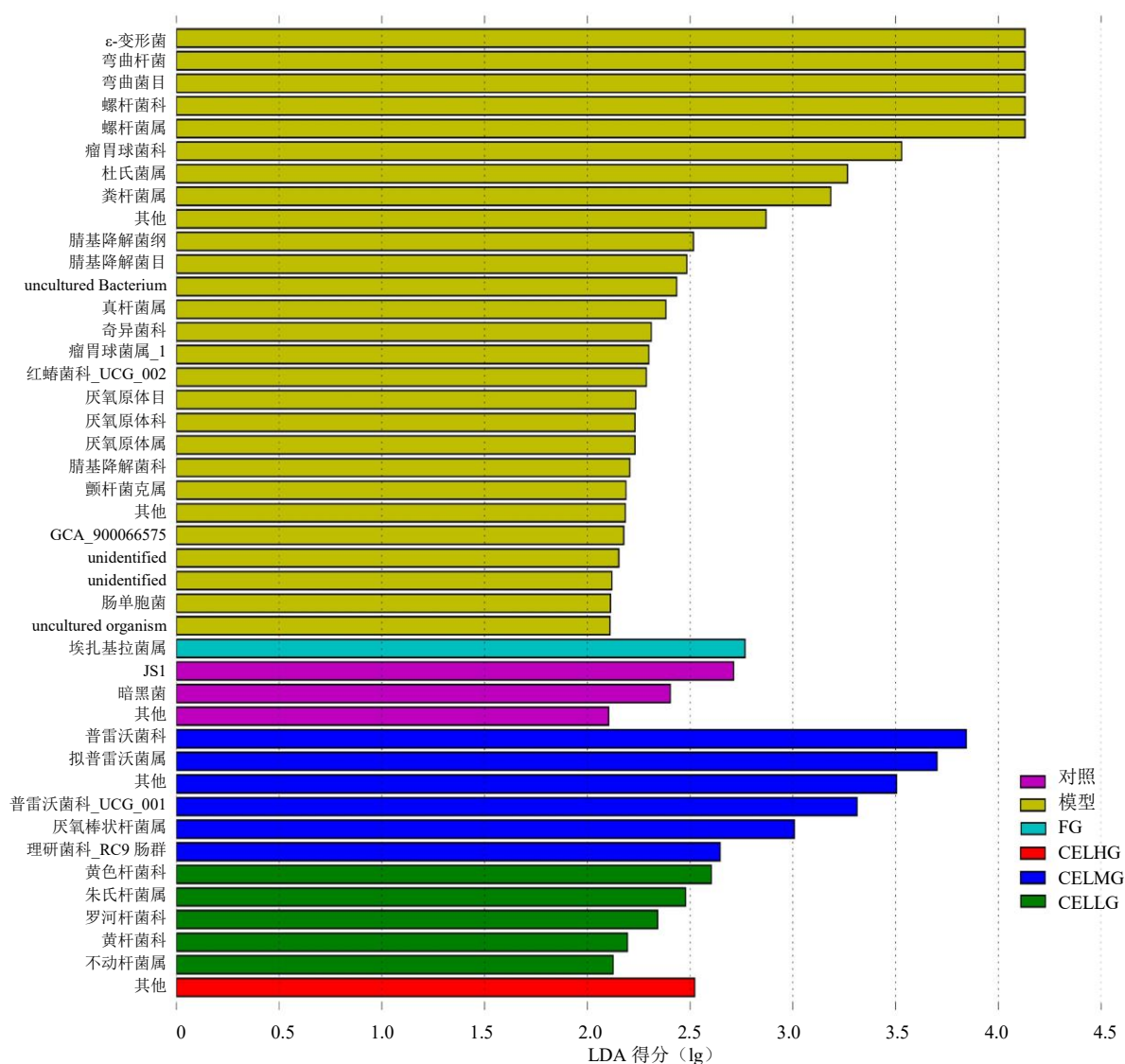


图 4 肠道菌群富集分析

Fig. 4 Gut microbiota enrichment analysis

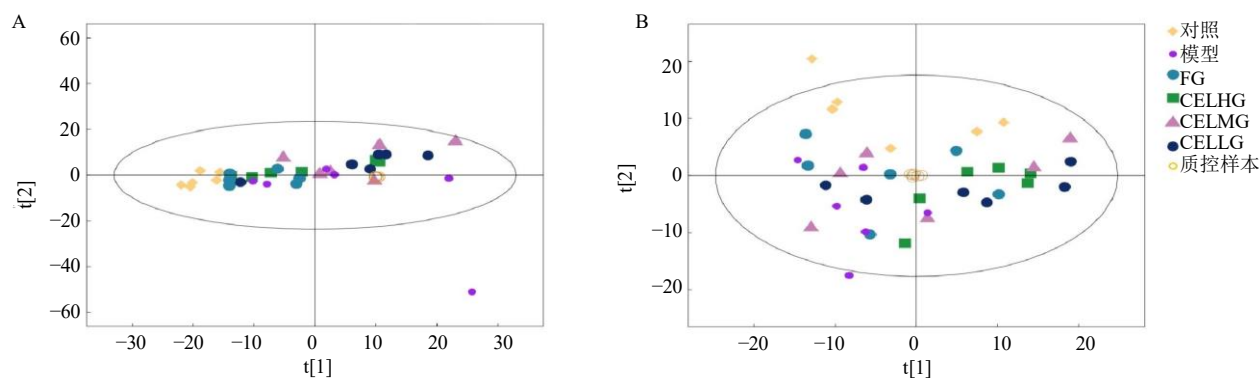
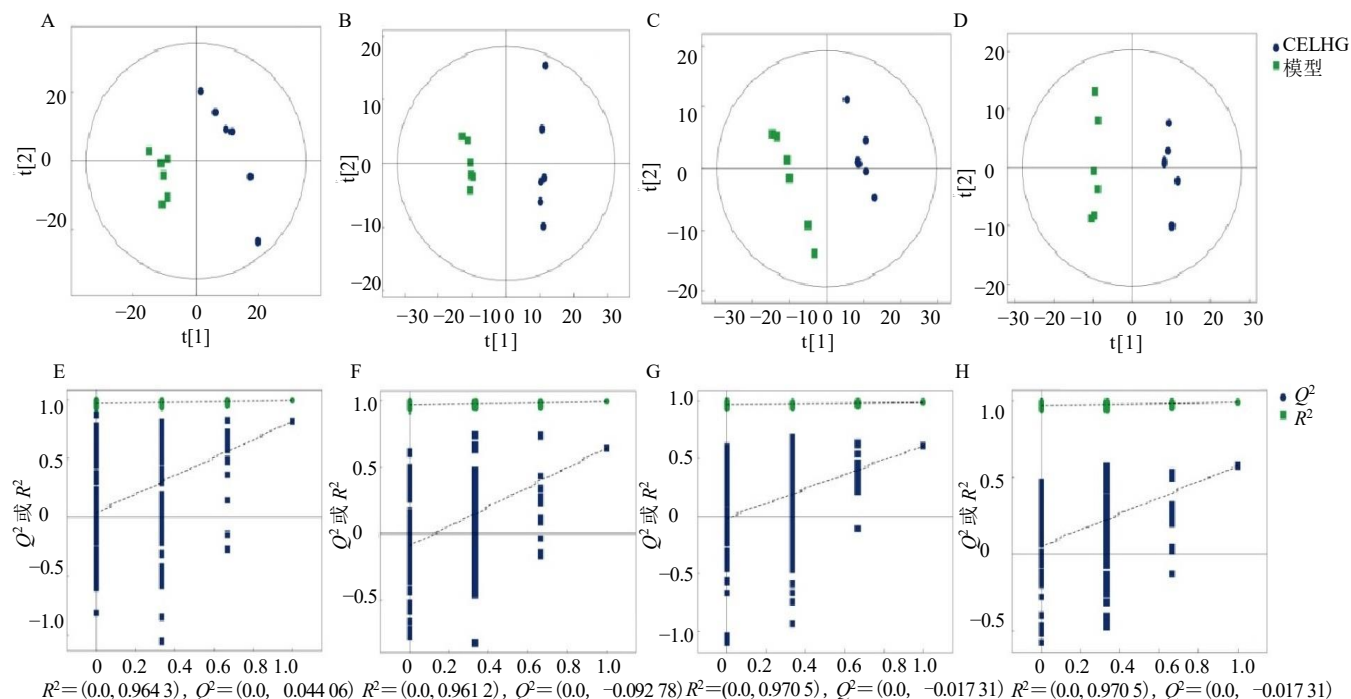


图 5 正 (A)、负 (B) 离子模式下样品 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plots of samples in positive (A) and negative (B) ion modes



A-正离子模式 PLS-DA 得分图; B-正离子模式 OPLS-DA 得分图; C-负离子模式 PLS-DA 得分图; D-负离子模式 OPLS-DA 得分图; E-正离子模式 PLS-DA 置换检验图; F-正离子模式 OPLS-DA 排列测验置换图; G-负离子模式 PLS-DA 置换检验图; H-负离子模式 OPLS-DA 排列测验置换图。

A-positive-ion mode PLS-DA score plot; B-positive-ion mode OPLS-DA score plot; C-negative-ion mode PLS-DA score plot; D-negative-ion mode OPLS-DA score plot; E-positive-ion mode PLS-DA score plot; F-positive-ion mode OPLS-DA 200-permutation test score plot; G-negative-ion mode PLS-DA score plot; H-negative-ion mode OPLS-DA 200-permutation test score plot.

图 6 多元统计分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Multivariate statistical analysis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

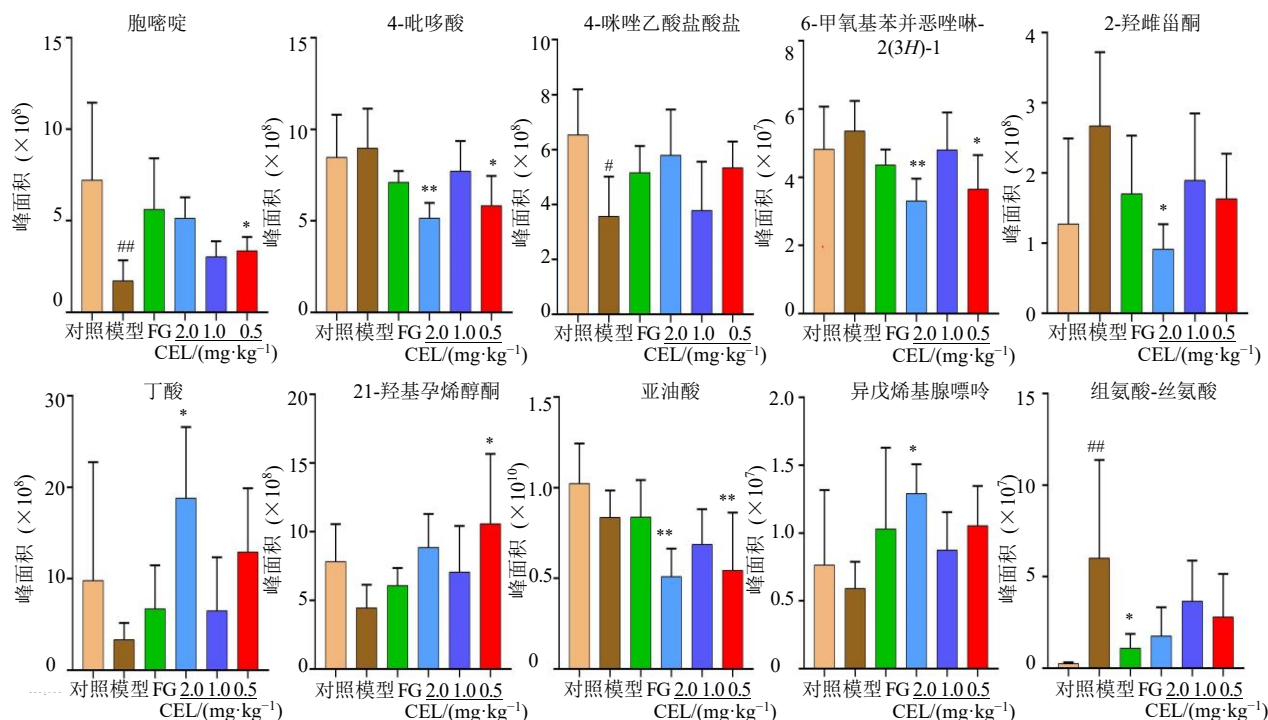


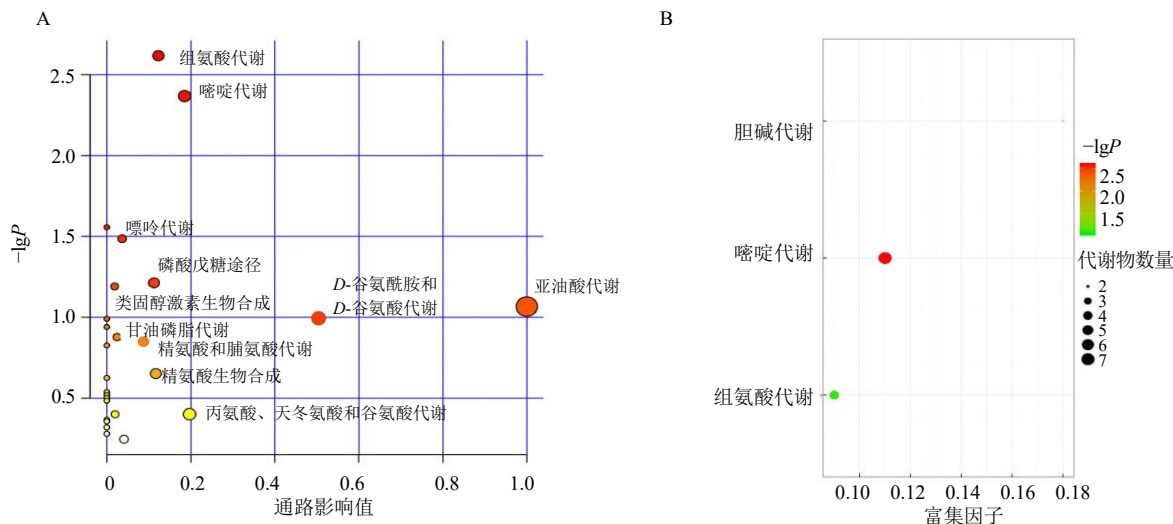
图 7 差异代谢物相对含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Relative content of differential metabolites ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 显著差异代谢物
Table 1 Significantly differential metabolites

序号	离子 模式	代谢物	<i>t</i> _R /s	<i>m/z</i>	HMDB ID	VIP	对照组	CELHG	CELMG	CELLG
							vs 模型组	vs 模型组	vs 模型组	vs 模型组
1	负离子	亚油酸	39.68	279.23	HMDB0000673	18.05	↓	↑	↑	↑
2	正离子	次黄嘌呤	167.63	137.05	HMDB0000157	14.15	↑	↓	↓	↓
3	负离子	丁酸	130.82	87.05	HMDB0000039	14.03	↓	↑	↑	↑
4	正离子	<i>N</i> -乙酰基组胺	146.41	154.10	HMDB0013253	12.68	↑	↓	↓	↓
5	负离子	脱氧肌苷	177.47	251.08	HMDB0000071	10.71	↑	↓	↓	↓
6	负离子	谷胱甘肽乙酯	28.95	275.07	HMDB0011737	10.64	↓	↑	↑	↑
7	正离子	胆碱	269.39	104.11	HMDB0000097	9.66	↑	↓	↓	↓
8	正离子	苯肾上腺素	120.44	168.11	HMDB0002182	8.82	↑	↓	↓	↓
9	正离子	肌酸	338.99	132.08	HMDB0000064	8.78	↑	↓	↓	↓
10	负离子	尿嘧啶	85.45	111.02	HMDB0000300	8.67	↓	↑	↑	↑
11	负离子	21-羟基孕烯醇酮	158.00	331.25	HMDB0004026	7.64	↓	↑	↑	↑
12	负离子	氢化肉桂酸	100.81	149.06	HMDB0000764	7.40	↑	↓	↓	↓
13	负离子	4-吡哆酸	38.82	182.05	HMDB0000017	6.77	↑	↓	↓	↓
14	负离子	组氨酸-丝氨酸	100.00	241.08	HMDB0000273	6.61	↑	↓	↓	↓
15	正离子	胞嘧啶	191.10	112.05	HMDB0000630	6.50	↓	↑	↑	↑
16	正离子	17 α -乙炔基雌二醇	383.16	297.18	HMDB0001926	6.19	↑	↓	↓	↓
17	负离子	胸腺嘧啶	114.11	227.07	HMDB0000262	6.00	↓	↑	↑	↑
18	正离子	4-咪唑乙酸盐酸盐	311.35	127.05	HMDB0002024	5.42	↓	↑	↑	↑
19	负离子	壬二酸	36.61	523.31	HMDB0000784	5.41	↓	↑	↑	↑
20	正离子	11 β -羟基睾酮	311.47	251.18	HMDB0060339	5.04	↑	↓	↓	↓
21	正离子	5-甲基胞嘧啶	585.03	126.08	HMDB0002894	4.92	↓	↑	↑	↑
22	正离子	2'-脱氧肌苷	177.60	275.08	HMDB0000071	4.82	↑	↓	↓	↓
23	负离子	棕榈酸甲酯	104.32	315.25	HMDB0061859	4.75	↓	↑	↑	↑
24	负离子	次黄嘌呤核苷	168.14	267.08	HMDB0000195	4.74	↓	↑	↑	↑
25	正离子	丙氨酸-苯丙氨酸	322.67	237.16	HMDB0014859	4.18	↑	↓	↓	↓
26	负离子	6-磷酸葡萄糖酸	84.13	257.00	HMDB0001316	4.12	↓	↑	↑	↑
27	正离子	<i>N</i> -乙酰- <i>D</i> -半乳糖胺	252.58	244.08	HMDB0000212	3.88	↑	↓	↓	↓
28	负离子	黄嘌呤	209.28	151.03	HMDB0000292	3.85	↑	↓	↓	↓
29	负离子	<i>DL</i> -谷氨酸	383.33	146.05	HMDB0060475	3.64	↑	↓	↓	↓
30	负离子	16-羟基棕榈酸	76.91	271.23	HMDB0006294	3.39	↓	↑	↑	↑
31	负离子	异亮氨酸-脯氨酸	103.99	331.12	HMDB0000012	3.27	↓	↑	↑	↑
32	正离子	5,6-二氢-5-甲基尿嘧啶	152.95	129.07	HMDB0000079	2.90	↓	↑	↑	↑
33	负离子	丙酸	372.07	73.03	HMDB0000237	2.87	↓	↑	↑	↑
34	正离子	3-甲基腺嘌呤	233.85	150.08	HMDB0011600	2.80	↓	↑	↑	↑
35	负离子	假尿苷	236.94	243.06	HMDB0000767	1.98	↓	↑	↑	↑
36	正离子	三羟基粪甾烷酸	201.38	385.34	HMDB0001457	1.98	↓	↑	↑	↑
37	正离子	烟酸盐	210.11	124.04	HMDB0001488	1.94	↓	↑	↑	↑
38	正离子	尿刊酸	320.46	164.13	HMDB0000301	1.56	↑	↓	↓	↓
39	正离子	雌三醇	346.08	253.16	HMDB0000153	1.53	↑	↓	↓	↓
40	负离子	<i>D</i> -2-氨基丁酸	383.32	102.06	HMDB0000452	1.23	↓	↑	↑	↑
41	正离子	2-羟基甾酮	400.23	269.15	HMDB0000343	1.20	↑	↓	↓	↓
42	正离子	<i>N</i> ₆ -甲基腺嘌呤	120.65	150.10	HMDB0002099	1.17	↓	↑	↑	↑
43	负离子	吡啶-3-丙酮酸	353.60	202.07	HMDB0060484	1.12	↑	↓	↓	↓
44	正离子	6-甲氧基苯并恶唑啉-2(3 <i>H</i>)-1	39.37	166.05	HMDB0036582	1.11	↑	↓	↓	↓
45	正离子	1-硬脂酰- <i>SN</i> -甘油-3-磷酸胆碱	176.50	506.36	HMDB0010384	1.11	↑	↓	↓	↓

“↑”表示上调，“↓”表示下调。
“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.

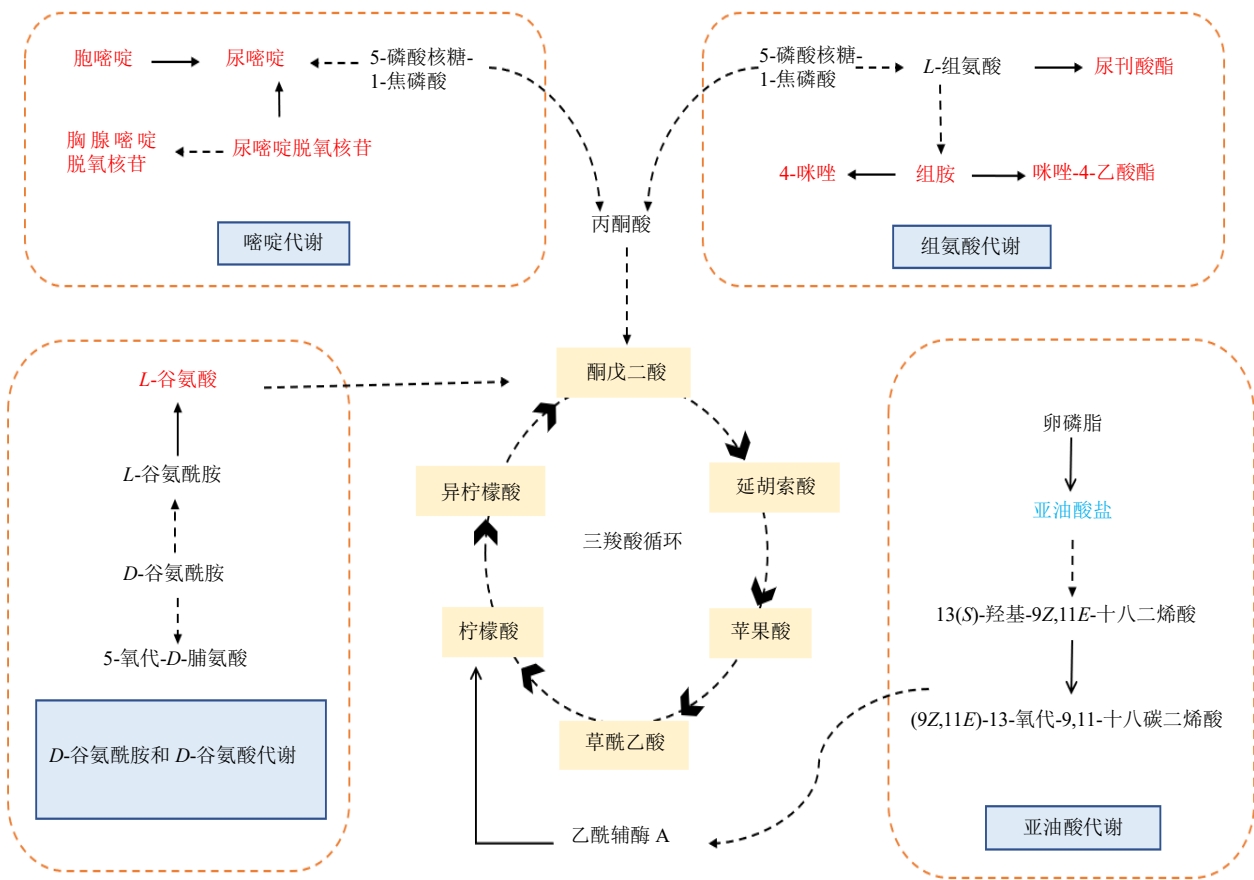


A-代谢通路富集分析气泡图; B-KEGG 富集通路。

A-bubble chart of metabolic pathway enrichment analysis; B-KEGG enrichment pathway.

图 8 代谢通路分析

Fig. 8 Metabolic pathway analysis



虚线为多步反应，实线为一步反应。红色和蓝色分别表示 CELHG 小鼠粪便中含量显著增加和减少的差异代谢物。

Dashed line is multi-step reaction and solid line is one-step reaction. Red and blue indicate significantly increased and decreased levels of differential metabolites in the feces of mice in CELHG, respectively.

图 9 代谢通路网络示意图

Fig. 9 Schematic diagram of metabolic pathway network

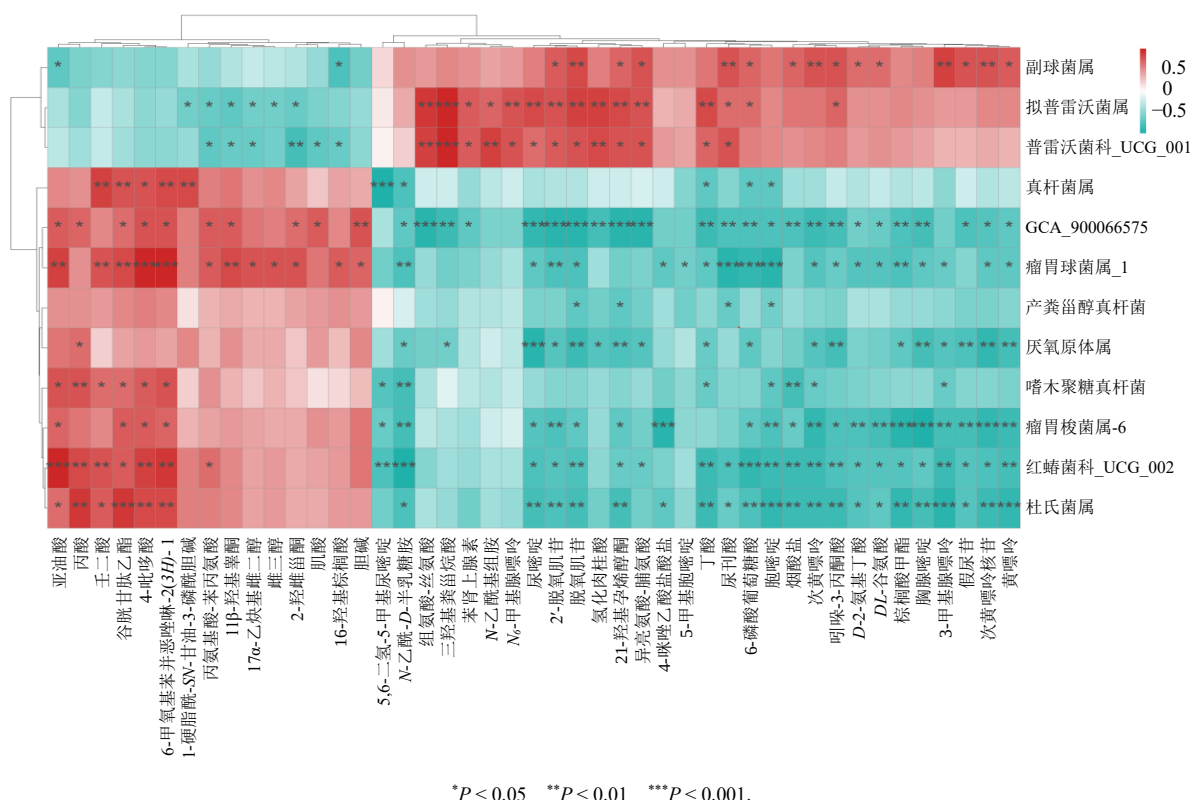


图 10 显著差异菌群与代谢物的相关性分析

Fig. 10 Hierarchical clustering heat map of correlation analysis of significantly different gut microbiota groups with metabolites

分析^[28-29], 能够较全面地阐释其作用机制, 也为进一步解释 CEL 治疗 HN 的分子机制提供可能。

CEL 是一种广泛存在于雷公藤等植物中的五环三萜类物质^[30]。研究证实, CEL 可通过诱导细胞凋亡、抑制癌细胞增殖、转移及新生血管而表现出良好的抗肿瘤活性^[31]。CEL 良好的免疫抑制及抗炎作用使其已被广泛用于治疗类风湿性关节炎^[21]。除此, CEL 还具有较强的抗氧化应激作用及神经保护作用, 可用于抗神经退行性疾病研究^[32]。但是, CEL 的不良反应大大限制其应用, 例如对造血系统的损伤及抑制尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶等^[33]。前期研究报道, 高剂量 CEL 对肾脏具有急性毒性作用^[34]。本研究采用低剂量 CEL 以防止其对小鼠肾脏造成损伤, 药效学结果显示, HN 小鼠在造模成功后表现出明显的肾功能损伤情况, 口服低剂量 CEL 后, 血生化指标 UA、CREA 和 UREA 水平显著降低, 且疗效优于阳性对照药物非布司他, 肾组织病理结果显示炎症和纤维化也明显改善, 证明 CEL 对 HN 小鼠具有一定的肾保护作用。

肠道菌群及衍生代谢产物与肾脏炎性及免疫反

应、物质代谢等存在着密切关系^[35]。研究发现, 肾脏疾病患者肠道中益生菌丰度下降伴随致病菌大量繁殖, 菌群失调直接破坏肠道屏障, 使肠道黏膜通透性增加, 导致细菌易位和肠源性毒素在血液循环系统中积聚, 激活炎症、氧化应激反应和纤维化途径, 加重肾损伤^[36-37]。肠道菌群失调在 HN 的发病机制中起着关键作用, 例如有益菌群已被证实是潜在的治疗策略^[38], 本研究中, 菌群多样性分析结果表明对照组和 CEL 组小鼠的肠道菌群比模型组小鼠更多样化, Chao1、Shannon 及 α 多样性指数显示, CEL 组显著高于模型组。 β 多样性分析显示, PCoA 对 CEL 组与模型组有显著聚类分离, 表明 CEL 可以增加模型小鼠的菌群多样性和物种丰富度, 并影响菌群结构。有研究报道, 乳酸菌可通过降低白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 等因子, 诱导免疫耐受和抑制 T 细胞效应调节促炎途径^[39]。本研究中, 给药后肠道菌群中的菌群在属水平上发现乳酸菌属的数量增加, 而幽门螺杆菌的数量减少。CEL 可增加乳酸菌的相对丰度, 因此乳酸菌可能是 CEL 的靶细菌之一。UA 是嘌呤代谢的最终产物, 肠道

中大肠杆菌产生黄嘌呤氧化酶可以影响 UA 的产生,而乳酸菌家族抑制大肠杆菌的生长间接抑制 UA 的积累^[40]。此外,模型组和 CEL 组小鼠的 LEfSe 分析显示,梭状芽胞杆菌、丹毒丝菌、杜氏杆菌属和瘤胃菌科是关键差异菌群类型。同时,普雷沃氏菌科和厌氧链球菌在 CEL 组中表现出相对丰度。瘤胃球菌科与肾功能损伤表现出很强的相关性,表明 CEL 对 HN 具有有利调节作用。此外,在 CEL 组中占主导地位且 LDA 评分最高的普雷沃氏菌科和拟普雷沃菌属与 HN 的缓解有关。

代谢物是肠道菌群在代谢性疾病发病机制中的主要参与者^[21]。一旦肠道菌群的微生态平衡被扰乱,即生态失调,就会引发一系列胃肠道和全身疾病^[41]。菌群失调会促进菌群产生毒素,代谢物通过被破坏的肠屏障进入循环系统,其中大部分被肾脏清除,也会滞留后导致肾功能障碍^[42]。为了探究 CEL 在影响代谢物中的作用,本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术测定小鼠粪便中差异代谢物的变化及相关代谢通路,在 CEL 高剂量组与模型组 2 组中鉴定出 45 种显著差异代谢物,并且获得 6 条主要的代谢途径,提示 CEL 对代谢通路调节的潜在作用。通过分析代谢途径的对应关系,发现两组之间的代谢相关途径存在明显差异,CEL 组亚油酸和吡啶-3-丙酮酸含量较高。前期研究表明,亚油酸在腺嘌呤诱导的小鼠慢性肾脏疾病中代谢水平降低,而丙酮酸是细菌细胞的关键代谢物,是氨基酸和蛋白质代谢的主要代谢物,也是糖酵解的最终产物,可以抑制过氧化氢引起的细胞凋亡,并促进脂肪酸的代谢,具有抗炎和促进自噬作用^[43]。此外,吡啶-3-丙酮酸被证明可以抑制小鼠结肠炎^[44]。综上,亚油酸和吡啶-3-丙酮酸的上调可能在一定程度上发挥了 CEL 的降 UA 和抗炎作用。

本研究整合 CEL 治疗 HN 的肠道菌群和代谢组学,探究上游菌群与下游差异代谢物的相关性,分析结果显示谷氨酰胺、亚油酸代谢、谷氨酸代谢、嘧啶代谢、组氨酸代谢是 CEL 治疗 HN 的关键代谢途径。CEL 可影响氨基酸、能量及脂质等代谢通路并调控肠道菌群结构及信号通路,从而发挥治疗 HN 作用。谷氨酸为细胞增殖提供必需的能量,充当合成重要细胞抗氧化剂如谷胱甘肽、精氨酸和脯氨酸的前体,这些抗氧化剂构成肠黏液中存在的糖蛋白^[45]。提示 CEL 可能通过调节粪便谷氨酸含量,改善肾功能受损。有研究表明,嘧啶代谢涉及一个

复杂的酶水解网络,该网络整合核苷回收、核苷酸合成和嘧啶催化降解。嘧啶代谢紊乱可能导致免疫系统、血液循环系统、神经系统等相关疾病,抑制嘧啶生物合成可有效治疗某些炎症性疾病^[46]。结果表明,差异表达的肠道菌群与粪便代谢物的变化密切相关。

综上,CEL 通过调节肠道菌群和代谢平衡等多种途径发挥其改善 HN 的作用。虽然 CEL 的抗肿瘤、抗炎、抗糖尿病和抗肥胖作用已被充分探究,但其对肠道菌群的影响尚未得到充分阐明。本研究表明,CEL 对 HN 的潜在保护机制与代谢途径的改变有关,还与菌群结构和代谢的相互调节有关。虽然肠道菌群的确切作用还需要进一步研究,但本研究为肾脏疾病的 CEL 治疗研究提供了一个新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu R, Han C, Wu D, *et al.* Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 762820.
- [2] Liu X, Qiu Y X, Li D H, *et al.* Effectiveness of drug treatments for lowering uric acid on renal function in patients with chronic kidney disease and hyperuricemia: A network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690557.
- [3] 鲍俊达, 王平, 田维毅. 中医药干预高尿酸血症的作用及其机制的研究进展 [J]. *贵州中医药大学学报*, 2022, 44(4): 55-61.
- [4] Hou W, Liu B, Xu H T. Celastrol: Progresses in structure-modifications, structure-activity relationships, pharmacology and toxicology [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 189: 112081.
- [5] 谷佳, 石雅宁, 邱韵, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨雷公藤红素抗血管重塑的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4874-4881.
- [6] Cheng M, Wu G, Song Y, *et al.* Celastrol-induced suppression of the miR-21/ERK signalling pathway attenuates cardiac fibrosis and dysfunction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1928-1938.
- [7] 杨静, 马景涛, 闫骏. 雷公藤红素通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对胃癌 MFC 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(8): 1517-1523.
- [8] Wu Q S, Wang J D, Wang Y F, *et al.* Targeted delivery of celastrol to glomerular endothelium and podocytes for chronic kidney disease treatment [J]. *Nano Res*, 2022, 15(4): 3556-3568.
- [9] Yu X W, Meng X, Xu M, *et al.* Celastrol ameliorates cisplatin nephrotoxicity by inhibiting NF- κ B and

- improving mitochondrial function [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 266-280.
- [10] Pan M L, Wang Z, Wang Y Y, *et al.* Celastrol alleviated acute kidney injury by inhibition of ferroptosis through Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115333.
- [11] Mei Y S, Dong B Z, Geng Z, *et al.* Excess uric acid induces gouty nephropathy through crystal formation: A review of recent insights [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 911968.
- [12] Tang M, Cao X, Zhang K, *et al.* Celastrol alleviates renal fibrosis by upregulating cannabinoid receptor 2 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 601.
- [13] 闫敏, 牛瑞兵, 段宝生. 肠道菌群在治疗高尿酸血症中的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2024, 21(12): 193-195.
- [14] Wang P, Zhang X Q, Zheng X, *et al.* Folic acid protects against hyperuricemia in C57BL/6J mice via ameliorating gut-kidney axis dysfunction [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(50): 15787-15803.
- [15] Wang Z L, Li Y C, Liao W H, *et al.* Gut microbiota remodeling: A promising therapeutic strategy to confront hyperuricemia and gout [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 935723.
- [16] Zhao H Y, Chen X Y, Zhang L, *et al.* *Lactocaseibacillus rhamnosus* Fmb14 prevents purine induced hyperuricemia and alleviate renal fibrosis through gut-kidney axis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106350.
- [17] Tong S T, Zhang P Y, Cheng Q, *et al.* The role of gut microbiota in gout: Is gut microbiota a potential target for gout treatment [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1051682.
- [18] Lin X H, Zou X J, Hu B F, *et al.* Bi Xie Fen Qing Yin Decoction alleviates potassium oxonate and adenine induced-hyperuricemic nephropathy in mice by modulating gut microbiota and intestinal metabolites [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116022.
- [19] Hua H, Zhang Y, Zhao F, *et al.* Celastrol inhibits intestinal lipid absorption by reprofiling the gut microbiota to attenuate high-fat diet-induced obesity [J]. *iScience*, 2021, 24(2): 102077.
- [20] Zeng D Q, Zhang L P, Luo Q. Celastrol-regulated gut microbiota and bile acid metabolism alleviate hepatocellular carcinoma proliferation by regulating the interaction between FXR and RXR α *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1124240.
- [21] Yang J J, Liu J Y, Li J, *et al.* Celastrol inhibits rheumatoid arthritis by inducing autophagy via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109241.
- [22] 王丛辉, 韩瑞, 李泽, 等. 整合代谢组学和肠道菌群探讨生、炒酸枣仁改善睡眠的作用机制特点 [J]. 药学报, 2023, 58(7): 1940-1951.
- [23] Amatjan M, Li N, He P K, *et al.* A novel approach based on gut microbiota analysis and network pharmacology to explain the mechanisms of action of *Cichorium intybus* L. formula in the improvement of hyperuricemic nephropathy in rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 107-128.
- [24] 谢昊宸, 张博恒, 穆卡然·艾买江, 等. 基于肠道菌群和系统药理学探讨藏药十五味乳鹏丸抗高尿酸血症肾病的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6068-6082.
- [25] 张瑶, 焦剑. 尿酸性肾病的中西医诊疗思路 [J]. 中国民间疗法, 2022, 30(4): 118-122.
- [26] Feng Y L, Cao G, Chen D Q, *et al.* Microbiome-metabolomics reveals gut microbiota associated with glycine-conjugated metabolites and polyamine metabolism in chronic kidney disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(24): 4961-4978.
- [27] 李旭萍, 吴颢, 薛国忠. 基于肠-肾轴学说探究肠道菌群失调与慢性肾脏病的交互影响 [J]. 中医临床研究, 2024, 16(7): 137-141.
- [28] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459.
- [29] 刘昌孝, 司端运, 万仁忠, 等. 代谢组学与天然药物和中药研究 [J]. 中国天然药物, 2008, 2: 82-88.
- [30] Kannaiyan R, Shanmugam M K, Sethi G. Molecular targets of celastrol derived from thunder of god vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer [J]. *Cancer Lett*, 2011, 303(1): 9-20.
- [31] Pang X F, Yi Z F, Zhang J, *et al.* Celastrol suppresses angiogenesis-mediated tumor growth through inhibition of AKT/mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(5): 1951-1959.
- [32] Amir Yusri M A, Sekar M, Wong L S, *et al.* Celastrol: A potential natural lead molecule for new drug design, development and therapy for memory impairment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 1079-1096.
- [33] Giacco F, Du X L, D'Agati V D, *et al.* Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice [J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 291-299.
- [34] 吕英杰, 王帅珂, 吴苹, 等. 雷公藤红素的肝肾毒性分析及其对高脂饮食小鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 35-41.
- [35] Pan L B, Han P, Ma S R, *et al.* Abnormal metabolism of gut microbiota reveals the possible molecular mechanism of nephropathy induced by hyperuricemia [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(2): 249-261.

- [36] Lobel L, Cao Y G, Fenn K, *et al.* Diet posttranslationally modifies the mouse gut microbial proteome to modulate renal function [J]. *Science*, 2020, 369(6510): 1518-1524.
- [37] Yang T, Richards E M, Pepine C J, *et al.* The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 442-456.
- [38] Vieira A T, Fukumori C, Ferreira C M. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases [J]. *Clin Transl Immunology*, 2016, 5(6): e87.
- [39] 徐卓, 项想, 尚尔鑫, 等. 丹参茎叶总酚酸对 2 型糖尿病肾病小鼠肠道菌群和短链脂肪酸的调节作用 [J]. *药学报*, 2021, 56(4): 1035-1048.
- [40] Li W, Jiang Y H, Wang Y, *et al.* Protective effects of combination of *Radix Astragali* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* on kidney of spontaneously hypertensive rats and renal intrinsic cells [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(1): 46-53.
- [41] 马雷雷, 李静, 张婧, 等. 肠道菌群-菌群代谢产物-线粒体生物轴与糖尿病肾脏病 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(3): 735-739.
- [42] Kikuchi K, Saigusa D, Kanemitsu Y, *et al.* Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1835.
- [43] Borges N A, Barros A F, Nakao L S, *et al.* Protein-bound uremic toxins from gut microbiota and inflammatory markers in chronic kidney disease [J]. *J Ren Nutr*, 2016, 26(6): 396-400.
- [44] Aoki R, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, *et al.* Indole-3-pyruvic acid, an aryl hydrocarbon receptor activator, suppresses experimental colitis in mice [J]. *J Immunol*, 2018, 201(12): 3683-3693.
- [45] Zhao Y Y, Cheng X L, Wei F, *et al.* Intrarenal metabolomic investigation of chronic kidney disease and its TGF- β 1 mechanism in induced-adenine rats using UPLC Q-TOF/HSMS/MS(E) [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 692-703.
- [46] 张海彬. 微生物中嘧啶代谢途径的研究进展 [J]. *生物技术*, 2021, 31(6): 619-624.

[责任编辑 罗 曦]