

基于代谢组学探索小檗碱对 APC^{min/+}小鼠结直肠腺瘤的作用机制

杨庆万¹, 周松¹, 陈春兰¹, 张海波^{2*}, 肖政华^{3*}

1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医证国家重点实验室, 广东 广州 510120

3. 贵州中医药大学第二附属医院消化内科, 贵州 贵阳 550001

摘要: **目的** 探讨小檗碱抑制 APC^{min/+}小鼠结直肠腺瘤的作用机制。**方法** 随机取 8 只 C57BL/6 小鼠作为对照组, 将 APC^{min/+}小鼠随机分为模型组和小檗碱低、高 (50、100 mg/kg) 剂量组, 每组 8 只, 60%高脂饲料饲养, 持续给药 10 周, 观察结直肠肿瘤数量、最大肿瘤直径; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察结直肠病理表现, 免疫组化观察结直肠 ki67、p53 阳性率; 高分辨非靶向代谢组学检测各组血清代谢物, 运用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选差异代谢物, 对差异代谢物进行功能富集分析; RT-qPCR 检测结直肠组织中鸟氨酸转氨甲酰酶 (ornithine transcarbamylase, *OTC*)、精氨酸酶 1/2 (arginase 1/2, *ARG1/2*)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, *NOS2*)、精氨酸代琥珀酸裂解酶 (argininosuccinate lyase, *ASL*) mRNA 表达水平。**结果** 小檗碱可以显著减少 APC^{min/+}小鼠结直肠肿瘤数量与最大肿瘤直径, 改善肠道非典型增生和炎性浸润, 抑制 ki67 和 p53 阳性表达率 ($P < 0.001$); 代谢组学结果发现, 与对照组比较, 模型组小鼠有 145 个差异代谢物, 与模型组比较, 小檗碱组小鼠有 51 种差异代谢物, 功能富集分析显示精氨酸生物合成途径代谢物 *DL*-谷氨酸、*L*-瓜氨酸、*N*-乙酰-*L*-谷氨酸、*N*- α -乙酰-*L*-鸟氨酸在模型组小鼠血清中上调, 小檗碱治疗后下调; RT-qPCR 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肠道中 *OTC* 的 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.001$), *ARG1*、*ARG2*、*NOS2* 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 小檗碱低、高 (50、100 mg/kg) 剂量组可以恢复 *OTC* mRNA 表达 ($P < 0.001$)、抑制 *ARG1*、*ARG2*、*NOS2* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.001$)。**结论** 小檗碱对结直肠腺瘤的治疗作用可能与抑制血清精氨酸合成、调控精氨酸代谢关键基因表达有关。

关键词: 小檗碱; 结直肠腺瘤; APC^{min/+}小鼠; 精氨酸; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7736-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.017

Mechanisms of berberine on APC^{min/+} colorectal adenoma mice based on metabolomics

YANG Qingwan¹, ZHOU Song¹, CHEN Chunlan¹, ZHANG Haibo², XIAO Zhenghua³

1. The Second Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

3. Department of Gastroenterology, The Second Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To explore the mechanisms by which berberine (BBR) inhibits colorectal adenoma (CRA) in APC^{min/+} mice.

Methods A total of eight C57BL/6 mice were randomly selected as the control group. APC^{min/+} mice were randomly divided into the model group, low- and highdose (50, 100 mg/kg) BBR groups, with eight mice in each group. Mice were fed high-fat diet and administered treatment for 10 weeks. The number of colorectal tumors and the maximum tumor diameter were observed.

收稿日期: 2024-08-15

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (zyydxk-2023187); 贵州省高等学校中西医结合防治疾病转化医学重点实验室 (黔教技[2023]017 号); 贵州中医药大学中西医结合防治消化系统疾病科技创新人才团队建设项目 (贵中医 TD 合字[2023]001 号)

作者简介: 杨庆万 (1993—), 男, 博士研究生, 从事中西医结合防治结直肠癌前病变研究。E-mail: yqw20tsy@yeah.net

***通信作者:** 肖政华 (1977—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治消化系统疾病研究。E-mail: xiaozhenghua097@126.com

张海波 (1972—), 男, 教授, 从事中西医结合防治肿瘤研究。E-mail: haibozh@gzucm.edu.cn

Histopathological changes in the colorectal tissue were assessed using hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression rates of ki67 and p53 were evaluated via immunohistochemistry. Serum metabolites were detected using high-resolution untargeted metabolomics, and differential metabolites were identified using orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), followed by functional enrichment analysis. RT-qPCR was employed to assess the mRNA expression levels of ornithine transcarbamylase (*OTC*), arginase 1/2 (*ARG1/2*), nitric oxide synthase 2 (*NOS2*), and argininosuccinate lyase (*ASL*) in colorectal tissues. **Results** BBR significantly reduced both the number and size of colorectal tumors in APC^{min/+} mice, improved atypical hyperplasia and inflammatory infiltration in the intestine, and suppressed the positive expression rates of ki67 and p53 ($P < 0.01$, 0.001). Metabolomics identified 145 differential metabolites between the model and control groups, and 51 differential metabolites between the model and BBR groups. KEGG analysis revealed that metabolites in the arginine biosynthesis pathway, *DL*-glutamate, *L*-citrulline, *N*-acetyl-*L*-glutamate, and *N*- α -acetyl-*L*-ornithine—were upregulated in the model group but downregulated following BBR treatment. RT-qPCR results indicated that compared to the control group, the expression level of *OTC* mRNA was decreased in the intestines of model group mice ($P < 0.001$), while the mRNA expressions of *ARG1*, *ARG2* and *NOS2* were increased ($P < 0.001$). In comparison to the model group, the low- and high-dose BBR groups restored *OTC* mRNA expression ($P < 0.001$) and suppressed the mRNA expression levels of *ARG1*, *ARG2* and *NOS2* ($P < 0.001$).

Key words: berberine; colorectal adenoma; APC^{min/+} mice; arginine; metabolomics

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是最常见的一种消化道肿瘤, 居癌症死亡率第 2 位, 具有高复发和远处转移的特点, 造成了严重的社会负担^[1]。结直肠腺瘤 (colorectal adenoma, CRA) 是发生在结直肠黏膜上皮的良性肿瘤, 因可以通过“腺瘤-癌”途径逐渐转化为 CRC, 被认为是最为常见的 CRC 癌前病变^[2]。据报道 90% 的 CRC 由 CRA 进展而来, 阻断 CRA 的癌变进展对于减少 CRC 的发生具有关键意义^[3-4]。CRA 大致经过“正常肠上皮-不典型增生-腺瘤-早期癌-进展癌”5 个阶段发展为 CRC, 共历时 10~15 年^[5-6]。研究发现, 管状腺瘤患者 10 年累积 CRC 发病率为 2.7%, 管状绒毛腺瘤患者为 5.1%, 绒毛腺瘤患者为 8.6%, 而健康人为 2.1%^[2]。因此, 阻断 CRA 对防治 CRC 十分重要。

目前, 预防 CRA 癌变的方案主要包括调整饮食习惯、生活方式以及发现 CRA 后尽早切除病灶并定期随访。此外, 小檗碱等天然产物对预防 CRC 及 CRA 手术后复发有一定前景^[7]。研究表明, 口服小檗碱可降低结直肠腺瘤复发的风险^[8], 且能有效减少 CRA 术后 1~2 年复发率^[9]。尽管小檗碱能有效治疗 CRA, 但具体的作用机制仍待明确。

氨基酸、脂肪酸等代谢物可通过能量代谢、免疫调节和炎症机制影响 CRC 的发生和发展^[10], 因此, 血清代谢物在癌前状态的潜在作用引起了广泛关注。临床研究发现, CRA 患者的血清代谢产物与健康对照组存在显著差异, CRA 患者血清中丁酸浓度高于健康对照组, 而丁酸可能对 CRA 的发生有

促进作用^[11]。早期 CRC 患者的粪便菌群 α 多样性明显减少, 其菌群改变与色氨酸、胆汁酸代谢途径的增加有关^[12]。此外, 研究发现小檗碱可以通过调节粪便熊果苷等代谢物和真/优杆菌、瘤胃球菌等菌属, 改善葡萄糖和脂质代谢紊乱^[13]。因此, 本研究推测小檗碱可能通过调节血清代谢物而发挥对 CRA 的治疗作用。

本研究采用非靶向血清代谢组学技术探索 APC^{min/+} 小鼠血清代谢物的变化, 发现差异代谢物可被富集到精氨酸生物合成途径, 进一步通过实时荧光定量 PCR 检测发现肠道组织中精氨酸合成与代谢关键基因的 mRNA 表达存在组间差异, 证实盐酸小檗碱对 CRA 的治疗作用可能与调控精氨酸合成与代谢有关。

1 材料

1.1 动物

24 只 SPF 级雄性 APC^{min/+} 小鼠和 8 只 SPF 级雄性 C57BL/J 小鼠, 8 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自江西中洪博元生物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (苏) 2022-0016。小鼠饲养于相对湿度 50%~60%、温度 21~23 °C 的环境中, 饲养期间喂食高脂饲料, 自由饮水。本研究经贵州中医药大学动物伦理委员会评审批准 (伦理号 20230136)。

1.2 药品与试剂

60% 日粮型高脂饲料 (批号 2310-18) 购自贵州辉沅生物科技有限公司; RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒 (批号 Y1818) 购自北京天根生化科技有限公司; SYBR Green Master Mix、甲

醇、氨水(批号 2961636、73594、A470-500)均购自美国赛默飞世尔科技公司;盐酸小檗碱(批号 2230821001,质量分数 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;乙腈(批号 1499230-935)购自德国 Merck 公司;乙酸铵、苏木素染液(批号 73594、H9627)购自美国 Sigma Aldrich 公司;伊红染液(批号 YE2080)购自合肥博美生物科技有限责任公司;甲醛(AR 级,批号 1340040101602)购自四川西陇科学有限公司;中性树胶(批号 1004160)购自国药集团化学试剂有限公司;ki67 一抗(批号 HA721115)购自杭州华安生物技术有限公司;p53 一抗(批号 A3185)购自爱博泰克生物技术有限公司,HRP 标记山羊抗兔二抗(批号 GB22303)购自武汉赛维尔生物技术有限公司。

1.3 仪器

徕卡-2016 型转轮式切片机(德国徕卡公司);BMJ-A 型组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);Pannoramic 250 型数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH Hungary 公司);BA400 Digital 数码三目摄像显微摄像系统(厦门麦克奥迪实业集团有限公司);CFX96 Touch Deep Well 荧光定量 PCR(美国 Bio-Rad 公司);AB Triple TOF 6600 型质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

本研究采用自发形成 CRA 的 APC^{min/+}小鼠。适应性喂养 1 周后,8 只 C57BL/J 小鼠作为对照组,24 只 APC^{min/+}小鼠随机分为模型组和小檗碱低、高剂量(50、100 mg/kg)组^[14]。将小檗碱溶解后,小檗碱低、高剂量(50、100 mg/kg)组 ig 小檗碱溶液,对照组、模型组 ig 等体积生理盐水,1 次/d,治疗 10 周,各组小鼠禁食不禁水 8 h,心脏采血,剖取结直肠组织,用于组织病理学观察和后续实验。

2.2 HE 染色和免疫组化法观察结直肠组织病理变化

沿肠道纵轴解剖结直肠,计数结直肠肠腔内的肿瘤数量和最大肿瘤直径。使用 HE 染色观察肠道的病理变化。免疫组化染色观察 Ki67 和 p53 阳性细胞比例,阳性为棕黄色,计算阳性面积占比。HE 及免疫组化均采集 100、400 倍图像。

2.3 非靶向代谢组学分析

2.3.1 样品的制备 将血液样本 1 500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C,离心 15 min,获得血清。取 100 μ L 血清,加入 400 μ L

预冷甲醇-乙腈(1:1)去除蛋白,14 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C,离心 20 min,取上清于真空离心机中干燥,干燥后采用 100 μ L 乙腈-水(1:1)溶剂复溶,14 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C,离心 15 min,即得血清样品。

2.3.2 色谱-质谱分析条件

(1) 色谱条件: HILIC 型色谱柱;柱温 25 $^{\circ}$ C;体积流量 0.5 mL/min;进样体积 2 μ L;流动相为水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水(A)-乙腈(B);梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7.0 min, 95%~65% B; 7.0~8.0 min, 65%~40% B; 8.0~9.0 min, 40% B; 9.0~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12.0 min, 95% B。整个分析过程中样品置于 4 $^{\circ}$ C 自动进样器。

(2) 质谱条件: 样品经 UHPLC 分离后,使用 AB SCIEX 质谱仪电喷雾电离(ESI)正负离子模式进行分析。ESI 源参数 Gas1 和 Gas2 均 60 psi(1 psi=6.895 kPa),气帘气(CUR)30 psi,离子源温度 600 $^{\circ}$ C,喷雾电压(ISVF) ± 5 500 V。一级质荷比检测范围 m/z 60~1 000,二级质荷比范围 m/z 25~1 000,一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(IDA),并通过峰强度筛选。去簇电压(DP) ± 60 V,碰撞能量设置为(35 ± 15) eV,IDA 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。

2.3.3 代谢组学数据处理与分析 原始数据采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。对 XCMS 提取得到的数据首先进行代谢物结构鉴定、数据预处理,然后通过 QC 样本总离子流图(total ion chromatogram, TIC)比较进行质控。通过比较 m/z ($< 1 \times 10^{-5}$)和内部对照品数据库的 MS/MS 谱图进行代谢物鉴定。对于代谢物数据进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。在 OPLS-DA 中,通常变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值大于 1.0 被视为该变量对分类模型具有重要贡献的依据, VIP>1.0 及 $P<0.05$ 可以较好地控制假阳性和假阴性结果^[15-16],本研究采用 VIP>1.0 及 $P<0.05$ 作为阈值筛选差异代谢物。通过 KEGG 数据库富集分析差异代谢物相关生物学途径。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测

结直肠组织加入适量裂解液,快速样本处理器匀浆 40 s,加入蛋白酶 K 10 μ L,室温放置 5 min,

离心后取上清经离心柱法提取 RNA，检测 RNA 完整性、浓度及纯度，统一调整为 100 ng/μL 的 RNA 溶液，逆转录合成一链 cDNA，cDNA 置于-20 ℃ 保存。采用 SYBR GREEN qPCR mix 进行 RT-qPCR，Bio-Rad CFX96 实时 PCR 检测系统采集数据，以 *GAPDH* 为内参，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算鸟氨酸转氨甲酰酶 (ornithine transcarbamylase, *OTC*)、精氨酸酶 1/2 (arginase 1/2, *ARG1/2*)、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, *NOS2*)、精氨酸代琥珀酸裂解酶 (argininosuccinate lyase, *ASL*) mRNA 相对表达水平。mRNA 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列
 Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>OTC</i>	F: TTTTGGTGTGGGAAGCCAGT R: GCATCCCGAATTTTGCAGCA
<i>ASL</i>	F: TGCAGGGAAGCTACACACAG R: TCTTCTGGGGCATCAAGCTG
<i>ARG1</i>	F: TGAGGAAAGCTGGTCTGCTG R: ATCACCTTGCCAATCCCCAG
<i>ARG2</i>	F: GGCTACAGCTGTGTCAACCAT R: ATCCAGAGCTGACAGCAACC
<i>NOS2</i>	F: GCCAACATGCTACTGGAGGT R: GCAAAGAGGACTGTGGCTCT
<i>ASL</i>	F: GCATCTTCTTGTGCAGTGCC R: TACGGCCAAATCCGTTTACA
<i>GAPDH</i>	F: GGTGTGCTCTCTGCGACTTCA R: TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

表 2 小檗碱对 APC^{min/+}小鼠肠道肿瘤数量、直径及 ki67、p53 阳性率的影响

Table 2 Effects of berberine on number and diameter of intestinal tumors, and positivity rates of ki67 and p53 in APC^{min/+} mice

分组	剂量/(mg·g ⁻¹)	肠道肿瘤/个	肠道最大肿瘤直/mm	ki67 阳性率/%	p53 阳性率/%
对照	—	—	—	1.17±0.65	5.37±0.85
模型	—	4.00±1.00 ^{###}	4.67±0.58 ^{###}	8.63±2.53 ^{###}	18.94±5.00 ^{###}
小檗碱	50	1.00±1.00 ^{***}	1.00±1.00 ^{***}	4.41±0.59 ^{**}	7.46±2.57 ^{**}
	100	0.67±0.58 ^{**}	1.00±1.00 ^{***}	3.93±1.22 ^{**}	8.64±1.66 ^{**}

与对照组比较：^{###}*P*<0.001；与模型组比较：^{**}*P*<0.01 ^{***}*P*<0.001。
^{###}*P*<0.001 vs control group; ^{**}*P*<0.01 ^{***}*P*<0.001 vs model group.

表明 ki67 主要表达在细胞核，p53 主要表达在细胞核、细胞浆；与对照组比较，模型组小鼠肠组织 ki67、p53 阳性表达量显著升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，小檗碱低、高剂量组小鼠结肠组织 ki67、p53 阳性表达量显著降低 (*P*<0.05)。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异采用单因素方差分析，满足正态分布且方差齐的数据用 Bonferroni 检验进行组间两两比较，方差不齐先用 Welch 检验进行总体均值比较，再用 Dunnett's T3 检验进行两两比较。

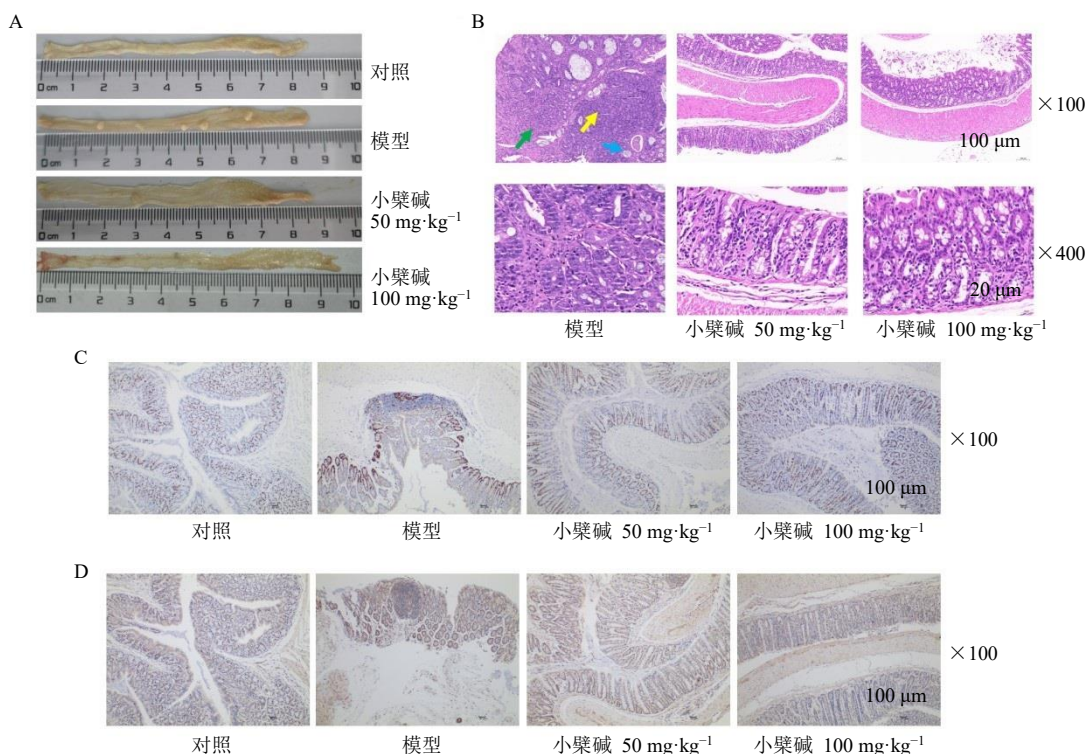
3 结果

3.1 对 APC^{min/+}小鼠肠道肿瘤数量、大小及病理变化的影响

如表 2、图 1-A 所示，模型组结直肠腔内可见散在多发性肿瘤，肿瘤最大直径约 6 mm；与模型组比较，小檗碱低、高剂量组小鼠结直肠腔内肿瘤较少，肿瘤数量及最大直径显著降低 (*P*<0.01、0.001)。如图 1-B 所示，模型组结肠组织明显受损，结构紊乱，上皮增生明显，多为腺管样，局部区域腺管呈分支样，具有组织异型性，增生区域黏膜突出隆起；增生腺体排列紧密，间质较少或基本消失，杯状细胞偶见或基本不见，腺腔内可见嗜碱性黏液及坏死细胞碎片；局部区域上皮形成小乳头突入腺腔，腔面不整齐；增生上皮排列紊乱呈假复层或多层排列，胞核不规则，核质比增大，核分裂象活跃；小檗碱低剂量组结肠组织可见上皮腺管样增生，黏膜层轻微坏死伴炎细胞浸润；小檗碱高剂量组结肠黏膜层、黏膜下层、肌层结构清晰，分层明显，黏膜层上皮细胞形态正常，未见明显变性、坏死或脱落；提示盐酸小檗碱可减少肠道肿瘤非典型性增生和炎性细胞浸润。如图 1-C、D 及表 1 所示，免疫组化结果、

3.2 代谢组学实验数据质控评价

如图 2-A、B 所示，将 QC 样本 TIC 进行谱图重叠比较，各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠，说明在整个实验过程中仪器误差引起的变异较小、实验结果可靠。

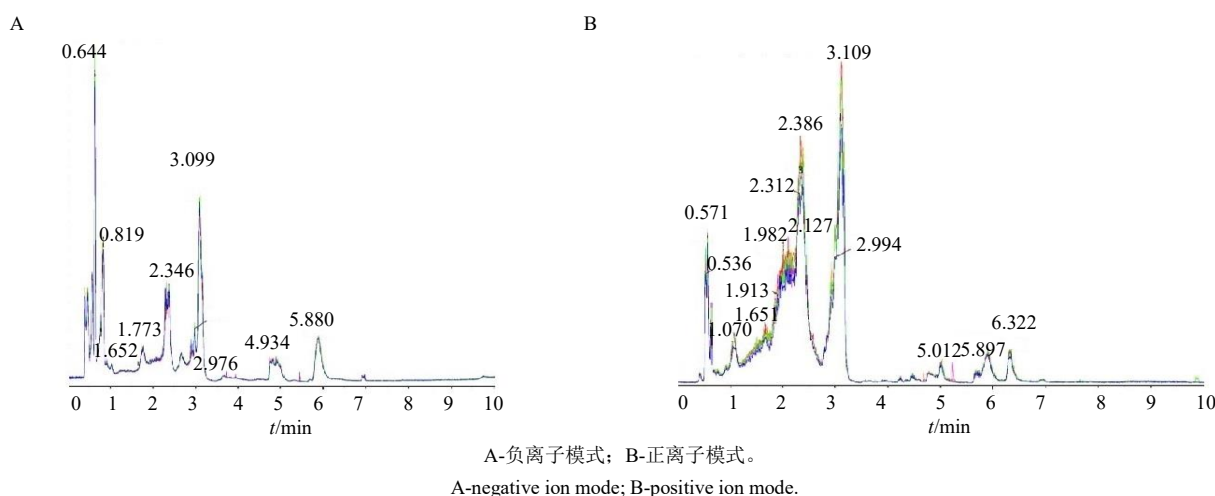


A-各组 $APC^{min/+}$ 小鼠肠道肿瘤数量与大小; B-HE 染色, 黄色箭头代表结肠增生腺体排列紧密, 蓝色箭头代表嗜碱性黏液, 绿色箭头代表黏膜及黏膜下层坏死炎症细胞浸润; C-免疫组织化学染色检测 ki67 的阳性表达; D-免疫组织化学染色检测 p53 的阳性表达。

A-number and size of intestinal tumors in $APC^{min/+}$ mice in each group; B-HE staining, yellow arrow represents tight array of colon hyperplastic glands, blue arrow represents basophilic mucus, and green arrow represents mucosal and submucosal necrosis with inflammatory cell infiltration; C-positive expression of ki67 was detected by immunohistochemical staining; D-positive expression of ki67 was detected by immunohistochemical staining.

图 1 小檗碱对 $APC^{min/+}$ 小鼠肠道肿瘤数量、直径、HE 染色及 ki67、p53 阳性率的影响

Fig. 1 Effects of berberine on number and diameter of intestinal tumors, HE and positive rates of Ki67 and p53 in $APC^{min/+}$ mice



A-负离子模式; B-正离子模式。
A-negative ion mode; B-positive ion mode.

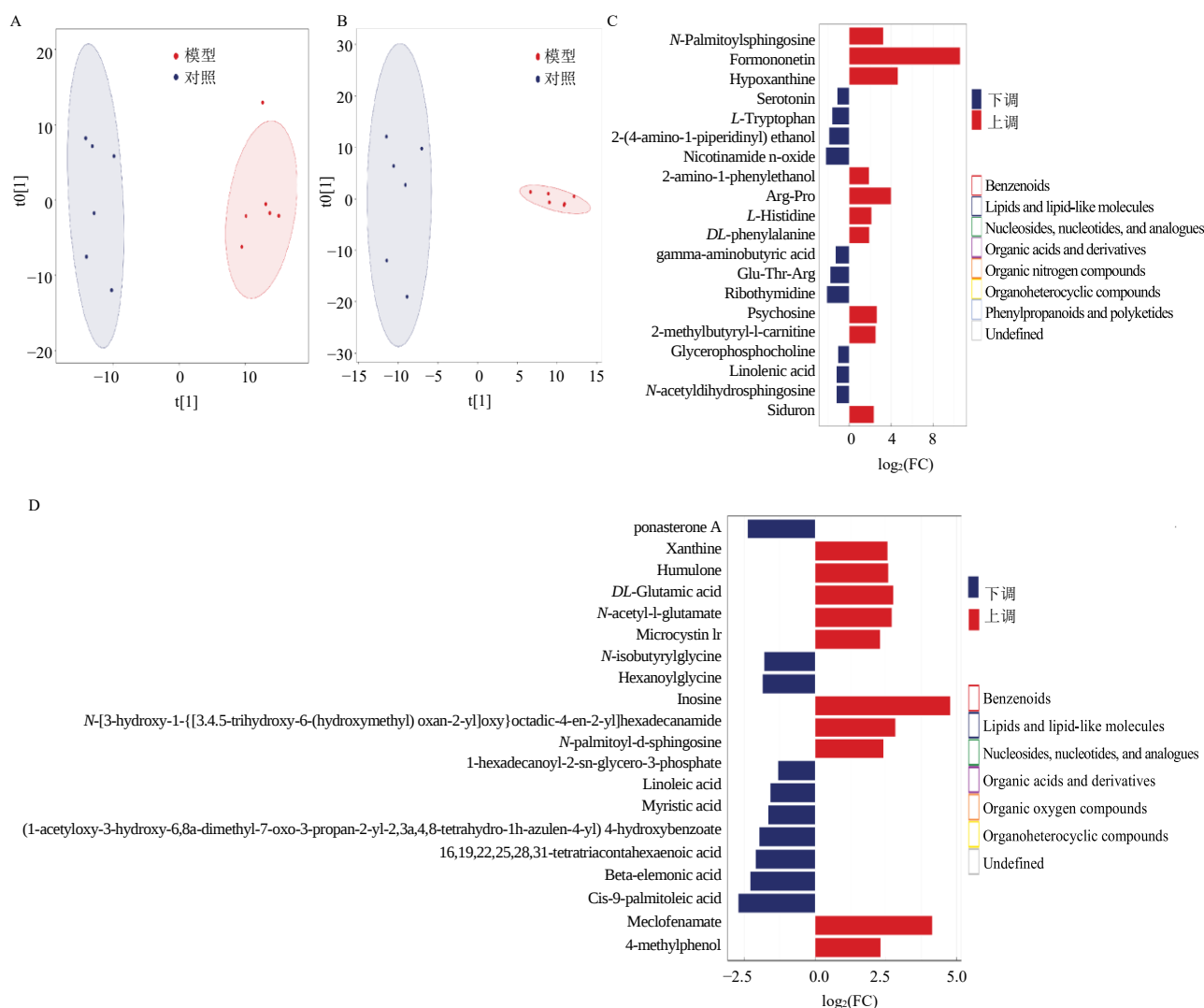
图 2 QC 样本 TIC 重叠谱图

Fig. 2 Overlapping TIC chromatograms of QC samples

3.3 $APC^{min/+}$ 小鼠与 C57BL/J 小鼠血清代谢成分的差异

使用非靶向代谢组学对小鼠血清样本进行分

析。OPLS-DA 显示, 在正、负离子模式下对照组、模型组代谢物有显著组间差异 (图 3-A、B)。负离子模式下有 74 种差异代谢物, 其中 51 种上调、23



A-负离子模式下模型组 vs 对照组差异代谢物的 OPLS-DA 评分图; B-正离子模式下模型组 vs 对照组差异代谢物的 OPLS-DA 评分图; C-正离子模式下模型组 vs 对照组中 20 种差异代谢物的表达差异倍数柱状图; D-负离子模式下模型组 vs 对照组中 20 种差异代谢物的表达差异倍数柱状图。

A-OPLS-DA score plot of differential metabolites between the model and control groups in negative ion mode; B-OPLS-DA score plot of differential metabolites between the model and control groups in positive ion mode; C-bar plot of fold changes in the expression of 20 differential metabolites between the model and control groups in positive ion mode; D-bar plot of fold changes in the expression of 20 differential metabolites between the model and control groups in negative ion mode.

图 3 APC^{min/+}小鼠与普通小鼠血清代谢物的差异

Fig. 3 Differences in serum metabolites between APC^{min/+} mice and normal mice

种下调; 正离子模式下有 71 种差异代谢物, 其中 42 种上调、29 种下调, 图 3-C、D 分别展示了排名前 10 的差异代谢物。

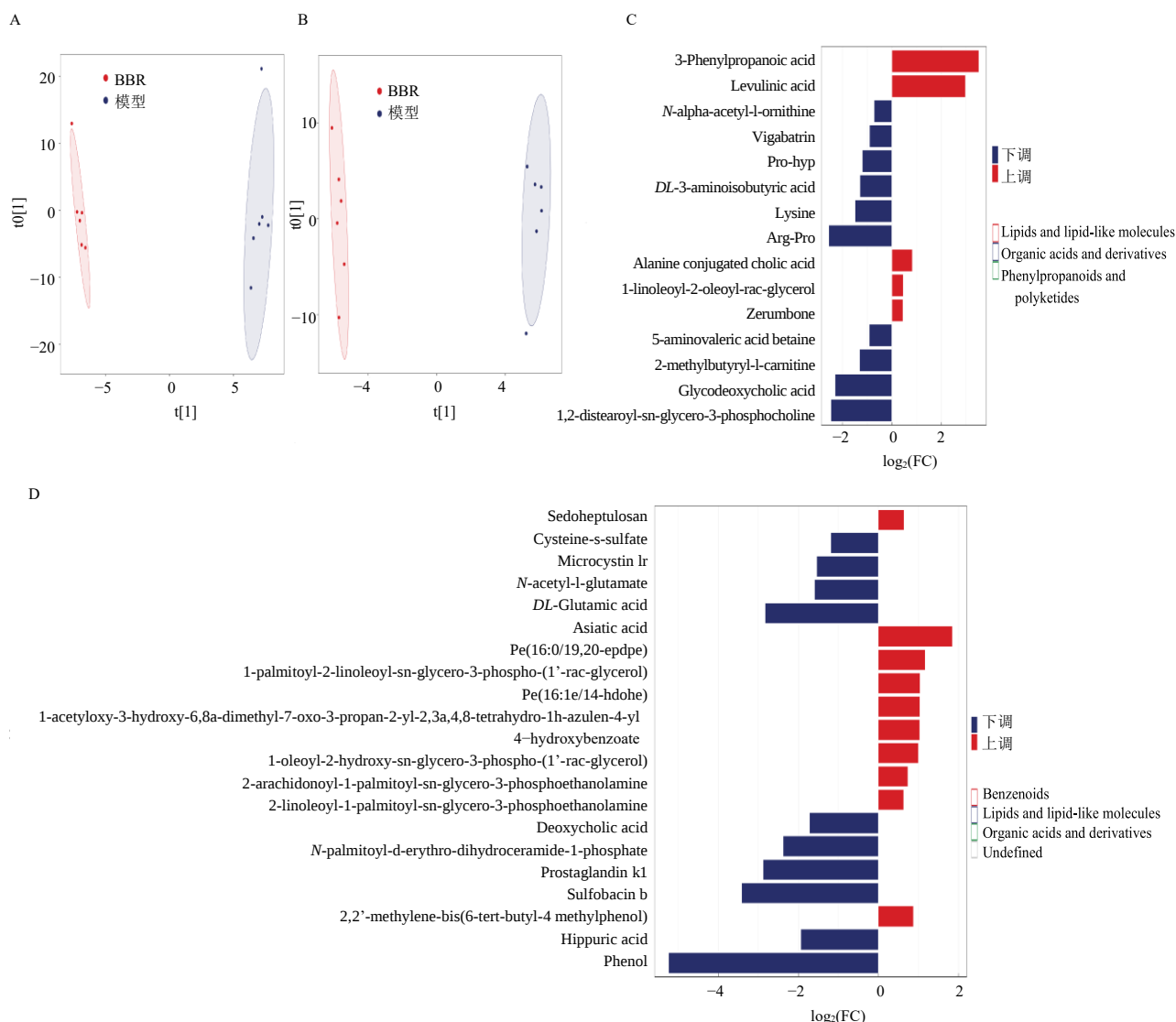
3.4 对 APC^{min/+}小鼠血清代谢物的影响

OPLS-DA 显示, 在正、负离子模式下模型组、小檗碱组小鼠代谢物有显著组间差异 (图 4-A、B)。正离子模式下有 17 种差异代谢物, 其中 5 种上调、12 种下调; 负离子模式下有 34 种差异代谢物, 其中 18 种上调、16 种下调, 图 4-C、D 分别展示了排

名前 10 的差异代谢物。

3.5 差异代谢物功能预测分析

通过对正负离子模式筛选到的差异代谢物进行 KEGG 注释分析, 探索差异代谢物相关途径。结果显示, 对照组与模型组间的差异代谢物被富集到代谢途径、蛋白质消化吸收、氨基酸生物合成、精氨酸生物合成等 30 种生物途径且均为上调 (图 5-A), 小檗碱组与模型组组间的差异代谢物被富集到精氨酸生物合成、氨基酸生物合成、蛋白质消化吸收、



A-负离子模式下小檗碱组 vs 模型组差异代谢物的 OPLS-DA 评分图; B-正离子模式下小檗碱组 vs 模型组差异代谢物的 OPLS-DA 评分图; C-正离子模式下小檗碱组 vs 模型组中 15 种差异代谢物的表达差异倍数柱状图; D-负离子模式下小檗碱组 vs 模型组中 20 种差异代谢物的表达差异倍数柱状图。

A-OPLS-DA score plot of differential metabolites between the BBR and MOD groups in negative ion mode; B-OPLS-DA score plot of differential metabolites between the BBR and model groups in positive ion mode; C-bar plot of fold changes in the expression of 20 differential metabolites between the BBR and model groups in negative ion mode; D-bar plot of fold changes in the expression of 15 differential metabolites between the BBR and model groups in positive ion mode.

图 4 小檗碱对 $APC^{min/+}$ 小鼠血清代谢物的影响

Fig. 4 Effect of BBR on serum metabolites in $APC^{min/+}$ mice

2-氧羧酸代谢等 15 种生物途径且均为上调 (图 5-B), 精氨酸生物合成均可被对照组与模型组、小檗碱组与模型组的差异代谢物富集。对精氨酸生物合成相关差异代谢物的表达绘制热图, 显示相关性分析显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 *DL*-谷氨酸、*L*-瓜氨酸、*N*-乙酰-*L*-谷氨酸、*N*- α -乙酰-*L*-鸟氨酸、尿素上调, 谷酰胺下调 (图 5-C); 与模型组比

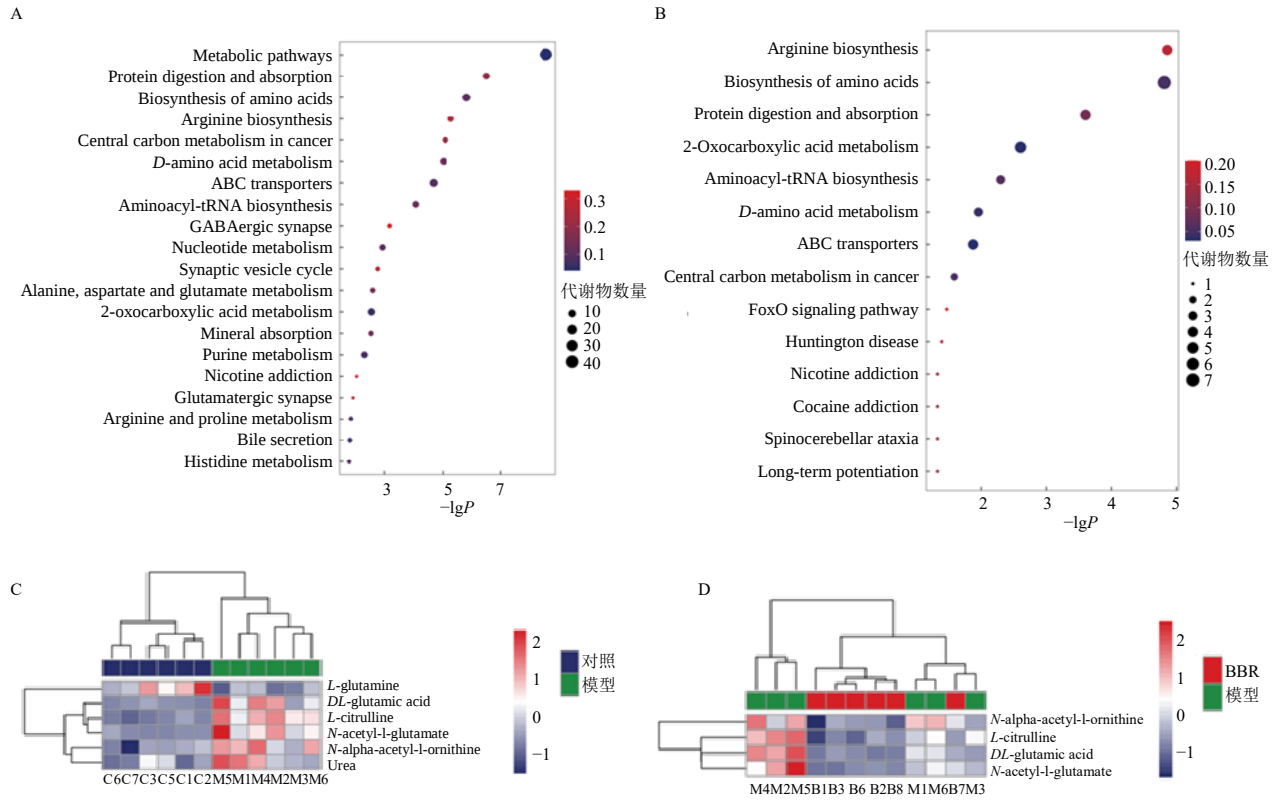
较, 小檗碱治疗后下调了小鼠血清 *DL*-谷氨酸、*L*-瓜氨酸、*N*-乙酰-*L*-谷氨酸、*N*- α -乙酰-*L*-鸟氨酸水平 (图 5-D), 推测小檗碱可能通过调节精氨酸生物合成途径发挥对 CRA 的作用。

3.6 对精氨酸合成与代谢相关 mRNA 表达的影响

在代谢组学明确小檗碱对精氨酸生物合成具有调控作用的基础上, 进一步通过 RT-qPCR 探

索小檗碱对 $APC^{min/+}$ 小鼠结肠组织中精氨酸合成与代谢关键基因表达的影响。结果显示，模型组小鼠肠道中 *OTC* 的 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.001$)，*ARG1*、*ARG2*、*NOS2* 的 mRNA 表达增加 ($P < 0.001$)；而小檗碱治疗可以恢复 *OTC* 的

表达、抑制 *ARG1*、*ARG2*、*NOS2* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.001$ ，图 6-A~C、E)。模型组 *ASL* mRNA 表达水平高于对照组和 BBR 低、高剂量组，但仅与低剂量组有统计学差异 ($P < 0.01$ ，图 6-D)。



A-模型组 vs 对照组差异代谢物的 KEGG 富集分析气泡图；B-小檗碱组 vs 模型组差异代谢物的 KEGG 富集分析气泡图；C-模型组 vs 对照组中被富集到精氨酸合成途径的差异代谢物表达热图；D-小檗碱组 vs 模型组中被富集到精氨酸合成途径的差异代谢物表达热图。

A-bubble plot of KEGG enrichment analysis for differential metabolites between the model and control groups; B-bubble plot of KEGG enrichment analysis for differential metabolites between the BBR and model groups; C-heatmap of differential metabolite expression enriched in the arginine biosynthesis pathway in the model vs control comparison; D-heatmap of differential metabolite expression enriched in the arginine biosynthesis pathway in the BBR vs model comparison.

图 5 KEGG 分析差异代谢物涉及的生物学过程

Fig. 5 KEGG analysis of biological processes involving differential metabolites

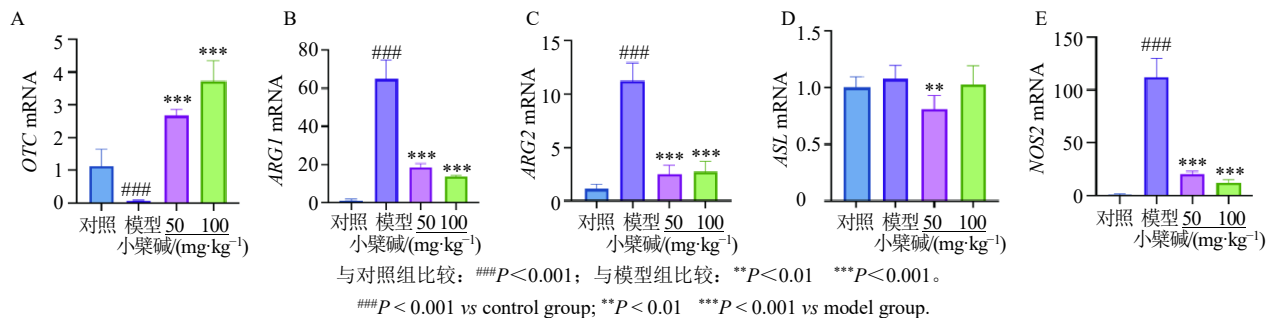


图 6 小檗碱调控小鼠肠道精氨酸合成与代谢途径关键基因表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 BBR regulates expression of key genes involved in arginine biosynthesis and metabolic pathways in mice colorectal ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

本研究给予高脂喂养的 $APC^{min/+}$ 小鼠小檗碱治疗 10 周, 发现小檗碱可以减少小鼠结直肠肿瘤数量和体积, 小檗碱治疗后可以改善肠道非典型增生和炎性细胞浸润程度, 抑制 p53 和 ki67 阳性表达。血清非靶向代谢组学分析结果发现, 与对照组比较, 模型组中 *DL*-谷氨酸、*L*-瓜氨酸、*N*-乙酰-*L*-谷氨酸、*N*- α -乙酰-*L*-鸟氨酸表达均上调, 而小檗碱治疗后上述代谢物表达下调, KEGG 通路富集分析提示精氨酸生物合成途径是最相关的生物途径。RT-qPCR 检测进一步证实, 模型组小鼠肠道中 *OTC* 的 mRNA 表达水平下降, *ARG1*、*ARG2*、*NOS2* 的 mRNA 表达增加; 而小檗碱各剂量组可以恢复 *OTC* 的 mRNA 表达水平、抑制 *ARG1*、*ARG2* 和 *NOS2* 的 mRNA 表达水平。提示小檗碱抑制 $APC^{min/+}$ 小鼠结直肠肿瘤形成可能与调节精氨酸合成与代谢相关。

精氨酸是一种组成人体蛋白质的半必需氨基酸, 同时也是一氧化氮、多胺、肌酸等重要代谢物质合成的重要底物, 在肿瘤代谢中具有重要作用。一方面, 癌细胞因其快速生成导致精氨酸等氨基酸代谢需求明显增加, 阻止氨基酸合成能够有效延缓肝癌、CRC 等恶性肿瘤的进展^[17]。另一方面, 精氨酸还与肿瘤细胞的免疫逃逸有关。

肿瘤细胞能够通过调节精氨酸的代谢来抑制免疫细胞的活性, 影响 NK 细胞及 T 细胞的生长和增殖, 促进免疫抑制性肿瘤微环境的形成, 导致免疫逃逸^[18-19]。精氨酸剥夺疗法通过精氨酸降解酶将循环精氨酸降解, 营造精氨酸缺乏环境, 已被证实对多种恶性肿瘤具有治疗效果^[20-21]。通常情况下精氨酸由精氨酸转运蛋白(cationic amino acid transporters, CAT)转运至细胞内或经瓜氨酸转化(尿素循环)合成。细胞内游离的氨与二氧化碳结合生成氨甲酰磷酸, 氨甲酰磷酸与线粒体内的鸟氨酸在 *OTC* 的催化下反应生成瓜氨酸, 瓜氨酸被运输到线粒体外并与天冬氨酸结合, 形成精氨酸琥珀酸, 然后经 *ASL* 作用裂解成精氨酸和瓜氨酸, 而精氨酸在 *ARG* 作用下分解为尿素和再生鸟氨酸, 尿素排除体外, 而鸟氨酸进入循环^[22]。此外, 精氨酸在 *NOS* 的催化下, 也可直接转化成一氧化氮和瓜氨酸^[23]。精氨酸合成与代谢异常是 CRC 的重要特征。首先, CRC 细胞系无法在无精氨酸培养基中增殖, 并且精氨酸剥夺或沉默 *ASL* 等精氨酸合成关键酶表达也可以减小 HCT116 皮下注射所致的肿瘤体积, 证实了精氨酸

是 CRC 细胞增殖与生长的必需^[24-25]。其次, 调节精氨酸代谢具有延缓动物模型的肿瘤进展, Zell JA 等人^[26]发现膳食补充精氨酸增加了 $APC^{min/+}$ 小鼠的高级别结肠腺瘤发生率, 而抑制精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)表达能够削弱精氨酸的促肿瘤作用; 细胞缺乏 *OTC* 导致精氨酸合成障碍, 而 *OTC* 在 CRC 中基本不表达, 因此更加依赖于外源性补充的精氨酸, 精氨酸剥夺可以减缓 CRC 小鼠体内的癌细胞生长^[27]; 二甲双胍可以抑制 HCT116 荷瘤裸鼠的肿瘤生长, 还增加了 HCT116 移植瘤体和结直肠癌细胞系中 AMPK 和 p53 表达, 降低了 CPS1、ARG1、*OTC*、*ODC* 等尿素循环酶表达^[28]。最后, 临床研究发现, 高水平精氨酸能够促进 CRA 癌变和 CRC 不良预后的发生, CRC 患者和健康对照组的血清代谢谱存在明显差异, 富集分析发现与精氨酸生物合成途径的相关性最大^[29]; 与高级别瘤变的 CRA 患者比较, CRC 患者血清精氨酸水平明显升高, 而瓜氨酸/精氨酸、鸟氨酸/精氨酸的值显著降低, 这 2 个值可以作为 *NOS* 和 *ARG* 的活性的标志^[30]; CRC 患者的血清 NO 水平明显高于 CRA, 调节 NO、*NOS* 能够阻断 CRA 向 CRC 进展, 而研究表明给予 CRA 患者 *L*-精氨酸后血清中 NO、iNOS 水平也有显著升高^[31]; Zell 等^[26]发现精氨酸摄入量高的 CRC 患者的总体生存率下降、死亡风险均有增加; Meng 等^[31]发现 *OTC*、*ASL* 高表达与直肠癌患者低生存率相关, 而上调抑癌基因 *p53* 可诱导 *ARG1*、*OTC*、*ODC1* 的表达下调。

精氨酸与 CRA 癌变、CRC 进展密切相关, 抑制精氨酸的合成可能是 CRC 防治新的干预途径。本研究通过非靶向代谢组学发现小檗碱能调节 $APC^{min/+}$ 小鼠精氨酸合成途径的血清代谢物的水平, RT-qPCR 发现小檗碱还能调控 $APC^{min/+}$ 小鼠肠道精氨酸代谢的关键基因表达水平。从代谢组学和分子生物学 2 种角度证实了小檗碱对 $APC^{min/+}$ 小鼠肠道肿瘤的疗效与调节精氨酸合成途径有关。然而, 本研究仅观察了小檗碱对肠道组织基因表达的影响, 关于小檗碱调节精氨酸代谢关键基因的机制仍需进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer*

- J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Song M Y, Emilsson L, Bozorg S R, *et al.* Risk of colorectal cancer incidence and mortality after polypectomy: A Swedish record-linkage study [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(6): 537-547.
 - [3] Zhang Y L, Zhang Z S, Wu B P, *et al.* Early diagnosis for colorectal cancer in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 21-25.
 - [4] Dekker E, Tanis P J, Vleugels J L A, *et al.* Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
 - [5] 陈万青, 李霓, 兰平, 等. 中国结直肠癌筛查与早诊早治指南 (2020, 北京) [J]. 中国肿瘤, 2021, 30(1): 1-28.
 - [6] Click B, Pinsky P F, Hickey T, *et al.* Association of colonoscopy adenoma findings with long-term colorectal cancer incidence [J]. *JAMA*, 2018, 319(19): 2021-2031.
 - [7] 国家消化系统疾病临床医学研究中心 (上海), 中华医学会消化内镜学分会, 中国抗癌协会肿瘤内镜专业委员会, 等. 中国结直肠癌癌前病变和癌前状态处理策略专家共识 [J]. 中华消化内镜杂志, 2022, 39(1): 1-18.
 - [8] Chen Y X, Gao Q Y, Zou T H, *et al.* Berberine versus placebo for the prevention of recurrence of colorectal adenoma: A multicentre, double-blinded, randomised controlled study [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(3): 267-275.
 - [9] Fang S S, Guo S, Du S J, *et al.* Efficacy and safety of berberine in preventing recurrence of colorectal adenomas: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114617.
 - [10] Órdenes P, Carril Pardo C, Elizondo-Vega R, *et al.* Current research on molecular biomarkers for colorectal cancer in stool samples [J]. *Biology*, 2023, 13(1): 15.
 - [11] Guo X D, Wang R Y, Chen R, *et al.* Gut microbiota and serum metabolite signatures along the colorectal adenoma-carcinoma sequence: Implications for early detection and intervention [J]. *Clin Chim Acta*, 2024, 560: 119732.
 - [12] Kong C, Liang L, Liu G, *et al.* Integrated metagenomic and metabolomic analysis reveals distinct gut-microbiome-derived phenotypes in early-onset colorectal cancer [J]. *Gut*, 2023, 72(6): 1129-1142.
 - [13] Fang X Y, Wu H R, Wang X M, *et al.* Modulation of gut microbiota and metabolites by berberine in treating mice with disturbances in glucose and lipid metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 870407.
 - [14] Qian Y, Kang Z R, Zhao L C, *et al.* Berberine might block colorectal carcinogenesis by inhibiting the regulation of B-cell function by *Veillonella parvula* [J]. *Chin Med J*, 2023, 136(22): 2722-2731.
 - [15] Ou J Y, Xiao M, Huang Y F, *et al.* Serum metabolomics signatures associated with ankylosing spondylitis and TNF inhibitor therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 630791.
 - [16] Li Y Y, Li J J, Shi Y H, *et al.* Urinary aromatic amino acid metabolites associated with postoperative emergence agitation in paediatric patients after general anaesthesia: Urine metabolomics study [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 932776.
 - [17] Cao F, Xia W Y, Dai S C, *et al.* Berberine: An inspiring resource for the treatment of colorectal diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115571.
 - [18] 李玖炎, 雷连成, 黄晶. 精氨酸代谢对肿瘤生长及肿瘤免疫的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(5): 999-1009.
 - [19] 杨芙蓉, 张雨婷, 陈志鹏, 等. 肿瘤代谢介导的免疫逃逸及血管生成研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(6): 756-760.
 - [20] 向鹏程, 屈少华, 韩俊毅. 精氨酸剥夺疗法在结直肠癌治疗中的研究进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2022, 37(2): 186-190.
 - [21] 李易泽, 黄敏. 代谢调控肿瘤微环境固有免疫应答机制研究进展 [J]. 药学报, 2022, 57(9): 2622-2641.
 - [22] Chu Y D, Lai M W, Yeh C T. Unlocking the potential of arginine deprivation therapy: Recent breakthroughs and promising future for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10668.
 - [23] Chen Y Y, Fei F, Ding L L, *et al.* Integrated gut microbiome and metabolome analysis reveals the inhibition effect of *Lactobacillus plantarum* CBT against colorectal cancer [J]. *Food Funct*, 2024, 15(2): 853-865.
 - [24] Wei X L, Chow H Y, Chong H C, *et al.* Arginine is a novel drug target for arginine decarboxylase in human colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13741.
 - [25] Huang H L, Chen W C, Hsu H P, *et al.* Silencing of argininosuccinate lyase inhibits colorectal cancer formation [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 163-170.
 - [26] Zell J A, Ignatenko N A, Yerushalmi H F, *et al.* Risk and risk reduction involving arginine intake and meat consumption in colorectal tumorigenesis and survival [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(3): 459-468.
 - [27] Alexandrou C, Al-Aqbi S S, Higgins J A, *et al.* Sensitivity of colorectal cancer to arginine deprivation therapy is shaped by differential expression of urea cycle enzymes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12096.
 - [28] Zhang T, Hu L, Tang J F, *et al.* Metformin inhibits the urea cycle and reduces putrescine generation in colorectal cancer cell lines [J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1990.
 - [29] Yi Y N, Wang J J, Liang C T, *et al.* LC-MS-based serum metabolomics analysis for the screening and monitoring of colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1173424.
 - [30] Tevini J, Eder S K, Huber-Schönauer U, *et al.* Changing metabolic patterns along the colorectal adenoma-carcinoma sequence [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(3): 721.
 - [31] Meng X Q, Peng J X, Xie X S, *et al.* Roles of lncRNA LVBU in regulating urea cycle/polyamine synthesis axis to promote colorectal carcinoma progression [J]. *Oncogene*, 2022, 41(36): 4231-4243.

[责任编辑 罗 曦]