

基于液质联用技术的白头翁汤治疗溃疡性结肠炎小鼠血清代谢组学分析

刘史佳¹, 吕翔宇^{1,2}, 熊玥³, 陈选青^{1,2}, 卢嘉微⁴, 陈玉根¹

(1.南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029;2.中国药科大学生命科学学院,江苏 南京 211198;3.江苏省畜产品质量检验检测测试中心,江苏 南京 210036;4.中国药科大学中药学院,江苏 南京 211198)



陈玉根

1967 年生,男,江苏东台人,主任中医师,研究员,博士研究生导师,江苏省“333 高层次人才培养工程”中青年领军人才,江苏省中医药领军人才,江苏省中医院(江苏省中医临床研究院)副院长,世界中医药联合会伦理审查委员会副会长,江苏省中西医结合学会理事,江苏省中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主任委员,南京中医药大学肿瘤协同创新中心临床负责人。

摘要:目的 研究白头翁汤给予溃疡性结肠炎小鼠前后内源性代谢物的变化,寻找与治疗溃疡性结肠炎有关的代谢生物标志物,探讨白头翁汤对溃疡性结肠炎模型的调节作用及其可能机制。方法 采用 DSS 复制小鼠溃疡性结肠炎模型,借助超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术,对各组小鼠血清样本进行测定,采用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)来筛选差异性代谢物。结果 经分析,对照组、模型组和白头翁汤治疗组血清样本能够得到很好的区分,共鉴定出 6 种潜在生物标志物,白头翁汤给药后溃疡小鼠的内源性代谢物水平发生不同程度的回调。结论 白头翁汤可以使 DSS 诱导的溃疡小鼠的异常代谢有所恢复,其治疗作用可能与机体内 6 个代谢物及 3 条相关代谢通路的调节有关。

关键词: 溃疡性结肠炎;代谢组学;超高效液相色谱-质谱;差异代谢物;白头翁汤

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2019)05-0535-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0535

引文格式:刘史佳,吕翔宇,熊玥,等.基于液质联用技术的白头翁汤治疗溃疡性结肠炎小鼠血清代谢组学分析[J].南京中医药大学学报,2019,35(5):535-540.

Serummetabonomics Analysis of Ulcerative Colitis Mice Treated by Baitouweng Decoction Based on UPLC/Q-TOF-MS

LIU Shi-jia¹, LYU Xiang-yu^{1,2}, XIONG Yue³, CHEN Xuan-qing^{1,2}, LU Jia-wei⁴, CHEN Yu-gen¹

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 2. School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, 211198, China; 3. Jiangsu Provincial Animal Product Quality Inspection and Testing Center, Nanjing, 210036, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing, 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the changes of endogenous metabolites before and after treatment of ulcerative colitis

收稿日期: 2019-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(81774096,81873309);江苏省自然科学基金(BK20161610);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSN-051);江苏省青年医学人才(QNRC2016642);中华中医药学会 2017—2019 年度青年人才托举工程项目(QNRC2-B04);高层次人才卫生人才项目(LGY2018061);江苏省中医院科技项目(Y18010,Y2018RC32)

第一作者: 刘史佳,男,副研究员,E-mail:liushijia2011@163.com

通信作者: 陈玉根,男,主任中医师,博士生导师,主要从事中医肛肠疾病研究,E-mail:chenyg666@126.com

in mice with Baitouweng Decoction, to find metabolic biomarkers related to the treatment of ulcerative colitis, and to explore the regulation and the possible mechanisms of Baitouweng Decoction on ulcerative colitis model. **METHODS** The mouse model of ulcerative colitis was constructed by DSS. The serum samples of each group were determined by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen for differential metabolites. **RESULTS** The serum samples of the control group, the model group and the Baitouweng Decoction group could be well distinguished. A total of six potential biomarkers were identified, and the endogenous metabolites of the mice were varying degrees of callbacks after the administration of Baitouweng Decoction. **CONCLUSION** Baitouweng Decoction could restore the abnormal metabolism of DSS-induced ulcerated mice, and its therapeutic effect may be related to the regulation of six metabolites and three related metabolic pathways.

KEY WORDS: ulcerative colitis; metabolomics; ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry; differential metabolites; Baitouweng decoction

溃疡性结肠炎(UC)是一种主要与直肠和结肠黏膜有关的非特异性炎性疾病,在我国其发病率呈现逐步增高的趋势^[1-3]。溃疡性结肠炎病情的反复发作会增加结直肠癌发生的可能性,溃疡性结肠炎患者患肠癌的发生率明显高于一般人群。已有许多研究显示,UC 的发病与免疫异常、炎症、环境遗传及感染等各种因素有关^[4]。目前,西医治疗炎症性肠病主要采用 5-氨基水杨酸、激素、免疫抑制剂等药物治疗、生物制剂及对症处理的手术治疗等方法。这些治疗方法对缓解炎症病情及并发症起到一定的作用,但不同药物分别存在疗效差、给药具有局限性及毒副作用大等弊端。因此,需要进一步开发研制疗效好、副作用小的药物,中医药则具有较好的优势^[2,5]。

白头翁汤源于张仲景《伤寒论》,由白头翁、黄连、黄柏、秦皮 4 味药物组成,具有清热泻火、解毒的功效,临床常用于治疗溃疡性结肠炎。课题组在前期研究中发现白头翁汤及其主要有效成分柠檬苦素对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠 UC 模型有很好的治疗作用^[6-9]。白头翁汤可以降低 DSS 模型小鼠的疾病活动指数(DAI)及潜血发生率,并能显著抑制促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6 的水平从而降低小鼠的肠道炎症损伤^[10-11]。

代谢组学被认为是最新兴的“组学”科学。代谢组学研究各种生物样本尤其是尿液和血浆、组织和细胞中的代谢特征^[12]。此外,代谢组学结果会受到各种因素的影响,如环境、时间、饮食、生理、药物、疾病、性别、遗传和年龄等。因此,代谢组学的一般目的是确定测量并解释细胞、组织和生物样本(如血液和尿液)中内源性代谢物随时间变化的浓度,活性和通量^[13]。本研究以代谢组学理论为基础,采用 UP-

LC/Q-TOF-MS 技术,动态检测白头翁汤给予 UC 小鼠前后的血清代谢产物变化规律,从代谢组学角度阐述 UC 小鼠血清中代谢产物的变化特点,为进一步发现白头翁汤治疗 UC 发病的潜在靶标和生物机制奠定基础。

1 材料

1.1 研究对象

选取购自江苏省南京市青龙山动物繁殖场 C57BL/6J 雄性小鼠 40 只,18~22 g,动物许可证号:SYXK(苏)2016-0011。12 h 光照/黑暗循环下饲养,温度(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度(50% $\pm$ 10%),适应性饲养至少 7 d。所有动物实验均严格按照美国国立卫生研究院关于实验室动物的护理和使用指南进行,并经中国药科大学动物伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器

白头翁汤方剂由白头翁 30 g,黄柏 24 g,黄连 12 g,秦皮 24 g 组成,购于南京中医药大学附属医院药学部,经南京中医药大学朱玉凤教授鉴定,以 1:10 的体积比在开水里煮 2 遍,各 1 h。水溶液过 5 层医用纱布,浓缩液合并成含生药 1 g/mL 药液,于 4 $^{\circ}$ C 条件保存。乙腈(TEDIA,色谱纯);甲醇(TE-DIA,色谱纯);甲酸(Fisher,色谱纯);DSS(美国 MPbio 公司);岛津 LC-30AD 液相色谱仪(日本岛津公司);AB Sciex Triple TOF 5600 质谱检测器(美国 AB 公司);Thermo 5430R 离心机;Sorvall Legend Micro 17 微量离心机。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 小鼠实验分组 将 40 只小鼠分为随机分为 3 组,空白对照组 10 只,模型组 15 只,白头翁汤组(0.2 g/d)15 只。

2.1.2 UC 小鼠模型的构建 给药方法及取样将 DSS 溶于饮用水,配成 3% DSS 溶液,让 C57BL/6 小鼠自由饮用 7 d,建立小鼠急性结肠炎模型。模型建立成功的标志为出现腹泻、半稀便、大便隐血(+)和肉眼血便等症状。造模开始同时灌胃给药,正常及模型组灌胃蒸馏水,持续 9 d。末次给药 24 h 后对所有小鼠进行眼球取血,取约 500 μ L 至 1 mL 于血清管中,转速 3 500 r/min,离心 10 min 取上清后转入 -80°C 冰箱中冻存待测。

2.2 样品前处理

取血清样品各 45 μ L,离心 10 s 后,加入 3 倍量乙腈沉淀蛋白,涡旋 30 s 后,静置 3 h。于 4°C 以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清 153 μ L 并挥干,再用 75 μ L 50%乙腈溶液复溶,离心后取 70 μ L 于进样小瓶中待测。同时将各组血清样品合并作为质量控制(QC)样品,以相同方法处理。每隔 10 个样品分析 QC 和空白样品,以检验分析方法的重复性。

2.3 色谱分析方法

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8 μ m),梯度洗脱采用流动相 A(1%甲酸水)和流动相 B(乙腈)。流速:0.4 mL/min;进样量 3 μ L;柱温: 40°C ;洗脱梯度程序:0.5 min,3% B;0.5~5 min,20% B;1.5~4 min,65% B;4~11 min,95% B;11~15 min,95% B;15~15.5 min,3% B;15.5~20 min,3% B。

2.4 质谱方法

AB SCIEX TripleTOF 5600,采用 ESI 离子源,质谱参数为:MS 质量范围 m/z 60~1 000;源温度 550°C ;雾化气压力 50 psi;辅助气压力 50 psi;气帘气压力 35 psi;离子扫描电压 5 500 V(正离子模式);MS2 质量范围 m/z 40~1 000。

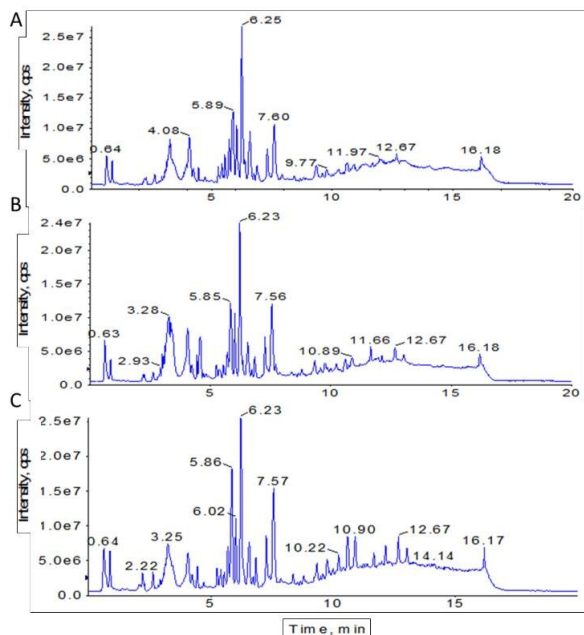
2.5 数据处理与统计分析

获取 UPLC/Q-TOF-MS 图谱后,采用 Analyst[®] TF 1.7 Software 导出原始数据,使用 Markview 软件进行峰对齐。最终得到一个包含质荷比、保留时间和峰面积三维数据表,将校正后的数据导入 SIMCA-14.0 软件(14.0 Version, Umertrica AB, Sweden)进行多维统计分析。通过 OPLS-DA 的 VIP 值筛选前后变化显著的差异代谢物,将找到的潜在差异代谢物在 HMDB(Human Metabolome Databatabase)、METLIN 和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库中检索与确认,得到最终匹配内源性代谢物。

3 结果

3.1 总离子流图(TIC)

采用 UPLC/Q-TOF-MS 方法检测获得正负离子 TIC 图(图 1)。从 TIC 图中可以直观地发现空白小鼠血清和 UC 及治疗组小鼠中存在一些差异。经过 80%去零规则消除缺失值^[14],一共提取出了 9 313 个正离子,4 046 个负离子。同时获取到相应的色谱峰高及峰面积。



注:A.正离子模式下空白对照组小鼠血清的 UPLC/Q-TOF 总离子流图;B.正离子模式下模型组小鼠血清的 UPLC/Q-TOF 总离子流图;C.正离子模式下白头翁组小鼠血清的 UPLC/Q-TOF 总离子流图

图 1 典型健康和 UC 模型小鼠血清的总离子流图

3.2 多变量统计分析

3.2.1 正离子模式下 UC 模型小鼠血清的代谢组学研究 采用 PCA 法探究 UC 模型小鼠血清正离子模式下的代谢谱变化,数据经预处理后,经过 PCA 分析得到一个有 5 个主成分的模型($R^2=0.694$, $Q^2=0.541$)和反映组间离散程度的得分图。PCA 得分图显示所有样本都落在 95%置信区间的椭圆形内。图 2 可见 3 组血清样本在空间上的分布情况。PCA 结果表明,3 组血清样本间能显著分离。用 OPLS-DA 分析方法去除与样品分类无关的信息,对血清全谱进行模式判别分析,结果显示 3 组样本能得到显著分离(图 3)。为了检验模型重复性是否良好,确保数据模型的可靠性,对模型进行置换验证(Permutation test)(图 4)。 Q^2 的截距为负值,模型有效。以上结果表明,血清样本的多变量数据模型符合参数标准,说明该模型具有较高的稳定性并

且预测能力良好。

力良好。

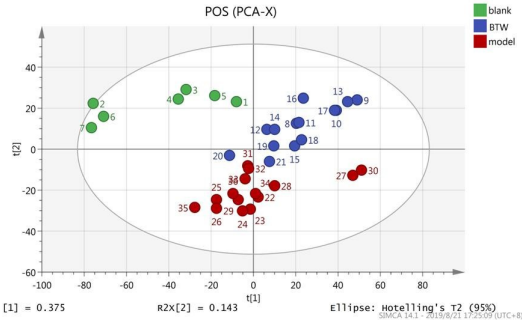


图 2 正离子模式下 UC 模型小鼠血清代谢轮廓的 PCA 得分图

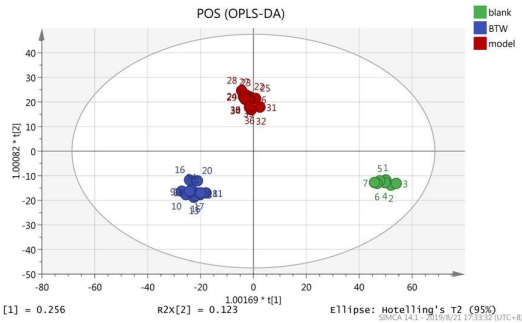


图 3 正离子模式下 UC 模型小鼠血清代谢轮廓的 OPLS-DA 得分图

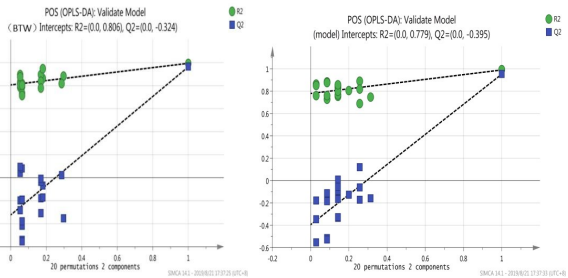


图 4 正离子模式下 UC 模型小鼠血清拟合模型的置换检验

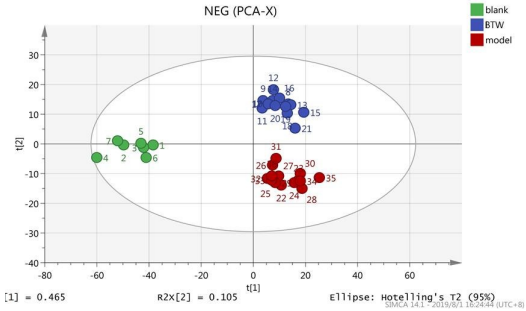


图 5 负离子模式下 UC 模型小鼠血清代谢轮廓的 PCA 得分图

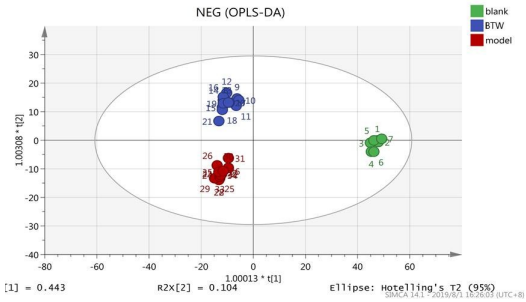


图 6 负离子模式下 UC 模型小鼠血清代谢轮廓的 OPLS-DA 得分图

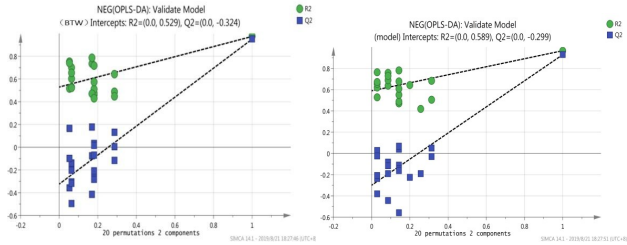


图 7 负离子模式下 UC 模型小鼠和健康小鼠血清拟合模型的置换检验

3.3 差异代谢物提取和解析

本研究使用 OPLS-DA 模型中的变量重要性投影(VIP)参数结合 T 检验进行组间差异比较,从而筛选潜在的生物标志物,VIP 值是两组中各代谢物含量显著改变相对应的参数,选择 $VIP>1, P<0.05$ 的情况来对应该代谢物是差异性代谢物。针对组间的比对情况,在模型组与给药组血清样本中找到主要差异性代谢物,其中倍数变化(FC)代表模型组与治疗组相比较血清代谢物峰面积的比值, $FC\geq 1$ 表明模型组血清中该代谢物质含量上升, $FC<1$ 表明模型组血清中该代谢物质含量下降。依靠大连达硕 OSI/SMMS2.0 数据库以及 KEGG, HMDB, MetaboAnalyst 等网上数据库检索对这 6 个差异代谢物结构进行鉴定,结果见表 1。

表 1 模型组与白头翁汤组相比较的血清差异性代谢物

分子式	名称	P 值	FC	VIP	Trend
					模型组 vs 白头翁汤组
C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-苯基丙氨酸	1.58E ⁻⁰⁴	2.59	1.27	↑
C ₉ H ₁₁ NO ₃	L-酪氨酸	1.26E ⁻⁰⁸	2.08	1.61	↑
C ₇ H ₁₉ N ₃	亚精胺	2.05E ⁻⁰³	2.22	1.16	↑
C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	γ-谷氨酰半胱氨酸	4.69E ⁻⁰⁴	2.94	1.22	↑
C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	肌苷	1.34E ⁻⁰⁵	17.36	1.80	↑
C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₆	尿苷	3.45E ⁻⁰⁴	2.15	1.43	↑

4 讨论

代谢组学是通过考察生物体受到刺激或者扰动后其代谢产物的各种变化来研究生生物体的不同代谢途径的一种技术。它通过现代仪器分析手段,定性定量研究生生物体体液(包括血浆、尿液、组织液、细胞培养液等)的内源性代谢物即代谢组。结合模式识别等化学信息学技术,分析生物体在病理生理刺激和遗传因素改变的条件下,不同时间、多方位的代谢变化。通过测定整个机体的系统代谢图谱来揭示生物体在多种时间、环境下的整体功能状态的一门学科。目前,代谢组学在生物标记物的发现、疾病的早期诊断、发病机制的研究以及药理药效评价等方面都发挥着重要的作用。目前已经被成熟的应用到了肿瘤、心脏病、糖尿病等重大疾病研究中。所有影响机体健康的因素(基因、环境、营养、药物和年龄等)均可反映在代谢组的结果中。代谢组学具有明显的整体反应性特点,这与和中药治疗多环节多靶点协同起效的整体性特点和优势十分吻合,这一技术方法有望在阐明白头翁汤治疗 UC 标志物的特色优势方面发挥重要作用。

本实验研究结果表明白头翁汤可以显著改善 DSS 模型小鼠的症状,研究中发现了一些代谢产物属于氨基酸代谢途径,苯丙氨酸和酪氨酸同属于苯丙氨酸代谢,二者可相互转化。而在克罗恩病和 UC 小鼠以及 DSS 诱导的大鼠的结肠黏膜中,已证实多巴胺的合成会受损^[15]。酪氨酸是合成多巴胺的重要原料。有研究表明,UC 小鼠模型中酪氨酸羟化酶活性下降,给药治疗后逆转上调,与本研究中药后酪氨酸代谢水平下调符合。据此,可以将酪氨酸及苯丙氨酸的代谢水平变化作为白头翁汤治疗 UC 靶点的一个研究方向。

有实验研究证明可溶性尿酸(sUA)可以通过激活 NLRP3 炎性小体而诱发肠上皮细胞功能障碍^[16]。sUA 具有直接促炎作用。已有研究表明高尿酸血症小鼠的肠道通透性高于野生小鼠。在体外

实验中,观察到 sUA 能激活 NLRP3 炎性小体并诱导 IL-1β 的释放。本研究发现治疗组尿酸的合成原料尿苷和肌苷都有所下调,可导致尿酸降低,肠道通透性好转。

此外,亚精胺和 γ-谷氨酰半胱氨酸属于谷胱甘肽代谢途径,与谷胱甘肽合成密切相关^[17]。在炎性肠病(IBD)的黏膜抗氧化反应研究中发现,IBD 黏膜中初级抗氧化酶(SOD)、次级抗氧化酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶的比率不平衡,内源性抗氧化反应的效率低下可能是 IBD 的发病和炎症过程持续存在的原因。谷胱甘肽对于维持胃肠道结构和功能的完整性具有重要的作用。谷胱甘肽缺乏的小鼠表现出空肠和结肠黏膜的严重退化,并出现体质量下降和腹泻。在 Sido 等^[18]的研究中发现,克罗恩病和 UC 模型小鼠血浆中谷胱甘肽的氨基酸前体的浓度在手术前后均有明显变化。本实验结果同样发现与空白对照组相比较,模型组小鼠血清中的亚精胺和 γ-谷氨酰半胱氨酸含量明显上升,白头翁汤干预后亚精胺和 γ-谷氨酰半胱氨酸含量下降。

本实验采用了 UPLC/Q-TOF 的分析检测方法分析了模型组及给药组的血清,发现白头翁汤给药组与模型组对照相比,在嘌呤代谢、氨基酸代谢以及谷胱甘肽代谢方面都发生了一定程度上的改变。通过对这些代谢产物及其代谢通路的深入研究,可为研究白头翁汤治疗溃疡性结肠炎疾病机制、预后或临床治疗提供一种新的思路。

参考文献:

[1] WANG Y,OUYANG Q. Ulcerative colitis in China: retrospective analysis of 3 100 hospitalized patients[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(9):1450-1455.

[2] JIANG XL, CUI HF. An analysis of 10 218 ulcerative colitis cases in China[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1):158-161.

[3] 胡品津, 钱家鸣, 吴开春, 等.我国炎症性肠病诊断与治疗的共识意见[J]. 内科理论与实践,2013, 8(1):61-75.

[4] GEREMIA A, BIANCHERI P, ALLAN P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. Autoim-

- mun Rev, 2014, 13(1):3-10.
- [5] 张声生, 李乾构, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识(2009)[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5):527-532.
- [6] 叶益平. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎临床疗效及对血清炎症因子水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6):321-365.
- [7] HAMDAN D, EL-READI MZ, TAHRANI A, et al. Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush[J]. Food Chem, 2011, 127(2): 394-403.
- [8] 刘史佳, 居文政, 张农山. 一种含有柠檬苦素治疗溃疡性结肠炎的药物及其制备方法和应用:CN103705525A[P]. 2014-04-09.
- [9] 王晓妹, 田歌, 段强军, 等. 白头翁汤正丁醇提取物对白念珠菌定植下溃疡性结肠炎小鼠的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 43(14):2979-2984.
- [10] 钟宇, 郑学宝, 叶华, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎大鼠的疗效及免疫机制的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 15-21.
- [11] 王彤, 王骁, 范焕芳, 等. 白头翁汤对溃疡性结肠炎模型小鼠结肠黏膜及血清 TNF- α 、IL-6 影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(2):32-35.
- [12] OLIVARES O, DABRITZ JHM, KING A, et al. Research in-
to cancer metabolomics: Towards a clinical metamorphosis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 43:52-64.
- [13] ALONSO A, MARSAL S, JULIA A. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2015, 3:23.
- [14] BIJLSMA S, BOBELDIJK I, VERHEIJ ER, et al. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation[J]. Anal Chem, 2006, 78(2): 567-574.
- [15] MAGRO F, VIEIRA-COELHO MA, FRAGA S, et al. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47: 216-224.
- [16] 史济华, 许乐. NLRP3 炎症小体与溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(7):989-992.
- [17] 王英, 罗敏, 李卉, 等. 谷胱甘肽的水平及氧化还原状态与炎症性肠病的关系[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(17):3079-3081.
- [18] SIDO B, HACK V, HOCHLEHNERT A, et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease[J]. Gut, 1998, 42(4):485-492.

(编辑:董宇)