

· 基础研究 ·

高分辨非靶代谢组学方法研究臻通集胶囊对
高脂血症模型大鼠的影响[△]侯红平¹, 王彩霞¹, 魏晓露¹, 高云航¹, 赵晓晓², 宋玲¹, 陈腾飞¹, 练东银¹, 李丽丽²,
彭博^{1*}, 张广平^{1*}1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 河北御芝林生物科技有限公司, 河北 石家庄 050035

[摘要] 目的: 通过高分辨非靶代谢组学方法探讨臻通集胶囊对高脂血症模型大鼠的作用特点和机制。方法: 无特定病原体级 SD 大鼠 40 只, 随机取 6 只作为对照组, 给予正常饲料, 其余所有大鼠给予高脂饲料喂养, 连续 4 周造模成功后, 分为模型组和给药组。高、中、低剂量给药组大鼠分别灌胃给予臻通集胶囊 0.432、0.216、0.108 g·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续给药 8 周。末次给药后将动物麻醉, 腹主动脉采血, 离心分离血清, 全自动生化仪检测血清中血脂水平。取部分肝组织用于高分辨非靶代谢组学的研究。结果: 臻通集胶囊给药后, 高、中剂量组大鼠的三酰甘油、胆固醇、低密度脂蛋白, 高剂量大鼠的高密度脂蛋白较模型组明显降低, 且差异具有统计学意义。与对照组比较, 模型组大鼠共检测出 138 个差异代谢物; 与模型组比较, 给药组大鼠共检测出 123 个差异代谢物, 正离子模式的 72 个差异代谢物有 24 个在给药后得到了纠正, 负离子模式的 51 个差异代谢物有 9 个在给药后得到了纠正。代谢过程涉及多个信号通路, 主要包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、环磷酸鸟苷酸依赖性蛋白激酶 (cGMP-PKG)、叉头框蛋白 O (FoxO)、蛋白质消化和吸收、嘧啶代谢、微生物消化和吸收、甘油磷脂代谢、氨基酸生物合成、嘌呤代谢等信号通路。结论: 臻通集胶囊能够有效改善高脂血症大鼠的血脂水平, 与其能够调节嘌呤代谢、嘧啶代谢、甘油磷脂代谢、mTOR 信号通路, cGMP-PKG 信号通路等密切相关。

[关键词] 高脂血症; 臻通集胶囊; 血脂水平; 代谢组学

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)04-0812-10

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220712002

Effect of Zhentongji Capsules on Hyperlipidemia Model Rats by High-resolution Untargeted MetabolomicsHOU Hong-ping¹, WANG Cai-xia¹, WEI Xiao-lu¹, GAO Yun-hang¹, ZHAO Xiao-xiao², SONG Ling¹, CHEN Teng-fei¹,
LIAN Dong-yin¹, LI Li-li², PENG Bo^{1*}, ZHANG Guang-ping^{1*}

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Hebei Yuzhilin Biotech Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

[Abstract] **Objective:** To explore the characteristics and mechanism of Zhentongji Capsules on hyperlipidemia model rats by high-resolution untargeted metabolomics. **Methods:** Forty SPF SD rats were used in this experiment. Six animals were randomly assigned to the control group and fed on a normal diet, and the remaining rats were given high-fat food. After modeling for four weeks, the model rats were divided into a model group and high-, medium-, and low-dose Zhentongji Capsules groups (0.432, 0.216, 0.108 g·kg⁻¹). Drug intervention was carried out by gavage, once a day for eight weeks. After the last administration, the animals were anesthetized, and blood samples were collected from the abdominal aorta. The serum was centrifuged, and the blood lipid level in the serum was detected by the automatic biochemical analyzer. Some liver tissues were taken for the study of high-resolution untargeted metabolomics. **Results:** After the administration of Zhentongji Capsules, the levels of triglyceride, cholesterol, and low-density lipoprotein in the high- and medium-dose

[△] **[基金项目]** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金项目 (ZZ13-YQ-060, ZXKT21020)

* **[通信作者]** 张广平, 研究员, 研究方向: 中药药理与毒理; E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn
彭博, 研究员, 研究方向: 中药药理与毒理; E-mail: bpeng@icmm.ac.cn

Zhentongji Capsules groups and high-density lipoprotein in the high-dose Zhentongji Capsules group were significantly lower than those in the model group. Compared with the results in the control group, 138 differential metabolites were detected in the model group. Compared with the results in the model group, 123 differential metabolites were detected in the treatment groups. Twenty-four of 72 differential metabolites in the positive ion mode and nine of 51 differential metabolites in the negative ion mode were corrected after administration. The metabolic processes involved multiple signaling pathways, mainly including mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, cyclic 3',5'- guanosine monophosphate-dependent protein kinase (cGMP-PKG) signaling pathway, forkhead transcription factor O (FoxO) signaling pathway, protein digestion and absorption, pyrimidine metabolism, microbial digestion and absorption, glycerol phospholipid metabolism, amino acid biosynthesis, and purine metabolism. **Conclusion:** Zhentongji Capsules can effectively improve the blood lipid level of hyperlipidemia rats, which was closely related to its ability to regulate purine metabolism, pyrimidine metabolism, glycerol phosphatide metabolism, mTOR signaling pathway, and cGMP-PKG signaling pathway.

[Keywords] hyperlipidemia; Zhentongji Capsules; blood lipid level; metabolomics

血脂异常通常表现为血总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) 升高, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 降低及上述血脂异常共同存在的混合型血脂异常, 根据病因可分为原发性和继发性2类, 前者多见于遗传性疾病, 后者主要见于糖尿病、肝肾疾病等全身性系统性疾病。2017年全球疾病负担 (global burden of disease, GBD) 的中国资料表明, 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 异常是中国心血管疾病 (CVD) 的第三大归因危险因素^[1]。而2012—2015年心血管健康研究 (CHS) 显示, 在我国年龄 ≥ 35 岁的居民血脂异常总体患病率为34.7%, 知晓率、治疗率、控制率分别为16.1%、7.8%、4.0%, 整体控制情况较差^[2]。因此, 对高脂血症预防和治理的研究具有非常重要的意义。

臻通集胶囊是以三七粉、黄芪提取物、丹参提取物、银杏叶提取物、葛根提取物、余甘子提取物、玉竹提取物为主要原料制成的保健品。上述成分经实验证明具有辅助调血脂和增强免疫力的作用^[3-5], 在本课题组前期实验中也证实臻通集胶囊能够改善血脂异常的症状^[6], 但其调节血脂代谢的机制尚不明确。本研究通过高分辨非靶代谢组学方法研究臻通集胶囊对高脂血症模型大鼠的影响, 为其治疗和预防高脂血症提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TBA-120FR型全自动生化分析仪 (佳能集团); Triple TOF 6600型质谱仪 (AB Sciex公司); 5430R型低温高速离心机 (Eppendorf公司); 1290 Infinity LC型超高压液相色谱仪 (Agilent公司)。

1.2 试药

臻通集胶囊 (批号: 202102010702, 河北御芝林药业有限公司); TG试剂盒 (批号: 01130C11)、TC试剂盒 (批号: 01126D11)、HDL试剂盒 (批号: 10222A11)、LDL试剂盒 (批号: 10223A11) 均购于北京安图生物工程有限公司; 乙腈 (Merck公司); 甲醇 (Fisher公司)。

1.3 实验动物

无特定病原体 (SPF) 级SD大鼠40只, 雄性, 体质量180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0011, 饲养于中国中医科学院中药研究所屏障环境动物房, 实验经中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会批准 (伦理批准号: 2021B125)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

随机取6只大鼠作为对照组, 给予正常饲料, 其余所有大鼠给予高脂饲料 (基础饲料+15%猪油+20%蔗糖+1.2%胆固醇+0.2%胆酸钠), 连续喂养4周后, 检测动物血清中的TG和TC, 与对照组比较明显升高且差异具有统计学意义, 视为模型成功。剔除不合格大鼠, 其余大鼠根据TC值随机分层分组, 分为模型组和高、中、低剂量给药组, 每组6只。

对照组大鼠正常饮食。模型组和给药组大鼠给予高脂饲料的同时, 高、中和低剂量组分别给予臻通集胶囊0.432、0.216、0.108 g·kg⁻¹ (2.0、1.0、0.5倍临床等效剂量), 灌胃给药, 每天1次, 连续

给药8周。

2.2 动物处理及指标检测

末次给药后,大鼠麻醉,腹主动脉采血,离心分离血清,全自动生化仪检测血清中TC、TG、HDL-C和LDL-C的含量。取部分中剂量的大鼠肝组织用于高分辨非靶代谢组学的研究。

2.3 高分辨非靶代谢组学分析

2.3.1 肝脏组织提取方法 大鼠肝脏组织解冻,取适量样本加入预冷的甲醇-乙腈-水溶液(2:2:1),涡旋混合,低温超声30 min, -20℃静置10 min, 14 000×g、4℃离心20 min,取上清液,真空干燥,质谱分析时加入乙腈水溶液(乙腈-水,1:1) 100 μL复溶,涡旋,14 000×g、4℃离心15 min,取上清液进样分析。

2.3.2 质量控制(QC)样本制备 QC样本是由待测样本等量混合制成,在待测样本超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)进样前、进样中和进样后上机检测。

2.3.3 色谱-质谱分析 色谱条件:Agilent 1290 Infinity LC型超高效液相色谱系统(Waters ACQUITY UPLC BEH Amide型色谱柱,100 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温为25℃;流速为0.5 mL·min⁻¹;进样量为2 μL;流动相A为水+25 mmol·L⁻¹乙酸铵+25 mmol·L⁻¹氨水,流动相B为乙腈;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)。

质谱条件:采用Triple TOF 6600型质谱仪进行样本一级、二级谱图的采集。分别采用电喷雾离子源(ESI)正离子和负离子模式进行检测。

2.4 数据处理

血脂水平的数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS

25.0软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。代谢组学数据经ProteoWizard 3.0.6428软件转换成.mzXML格式,然后采用XCMS 84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,再进行实验数据质量评价和数据分析。

3 结果

3.1 大鼠血清中的血脂水平检测

与对照组比较,模型组大鼠血清中TG、TC、HDL-C和LDL-C水平均明显升高,差异具有统计学意义,说明造模成功。臻通集胶囊高剂量能明显降低大鼠各项指标的水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),中剂量能降低TG、TC和LDL-C水平($P < 0.05$),见表1。

3.2 实验方法考察

3.2.1 QC样本相关性 对QC样本进行Pearson相关性分析,相关性图谱见增强出版附加材料。一般 $r > 0.9$ 表明相关性较好。实验结果表明,QC样本间的 r 均大于0.9,说明实验重复性较好。

3.2.2 总体样本Hotelling's T₂检验 Hotelling's T₂检验通过多元变量建模对样本进行检验,定义了95%或99%置信区间,可用于离群样本的诊断。Hotelling's T₂检验结果见图1。结果表明QC样本均在99%置信区间内^[7],说明实验的重复性好。

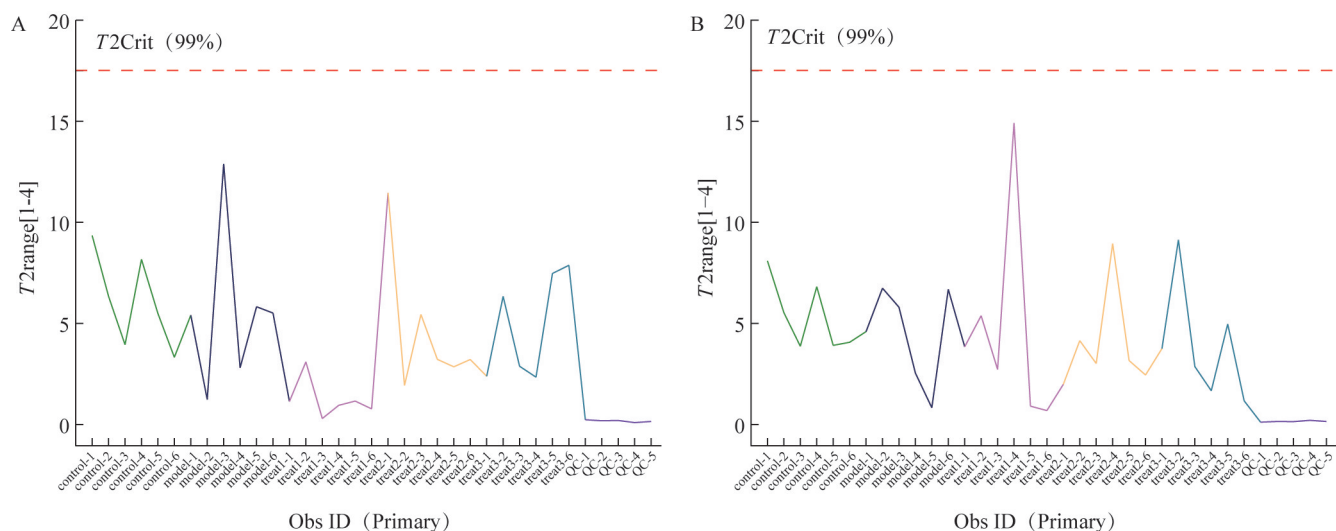
3.3 总体样本主成分分析(PCA)

将所有实验样本和QC样本提取得到的峰进行PCA,见图2。实验结果表明,正、负离子模式下QC样本紧密聚集在一起,说明实验的重复性好。同时,对照组和模型组明显分离,说明模型成功。经臻通集胶囊给药后,各组均向对照组方向回调,说明臻通集胶囊对高脂血症具有良好的干预作用。

表1 各组大鼠血清中TG、TC、HDL-C和LDL-C的水平($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照组		0.49±0.13	2.02±0.50	0.90±0.20	0.43±0.14
模型组		1.35±0.35***	5.46±0.98***	2.07±0.66*	1.55±0.51***
臻通集胶囊组	0.108	0.99±0.21	5.13±1.37	1.44±0.33	1.23±0.33
	0.216	0.77±0.20 [#]	3.86±1.04 [#]	1.38±0.36	1.01±0.31 [#]
	0.432	0.67±0.22 ^{##}	3.49±0.87 ^{##}	0.92±0.30 [#]	0.98±0.28 ^{##}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。



注: control. 对照组; model. 模型组; treat1. 臻通集胶囊低剂量组; treat2. 臻通集胶囊中剂量组; treat3. 臻通集胶囊高剂量组; 图2同。

图1 臻通集胶囊给药后大鼠血清总体样本 Hotelling's T^2 检验

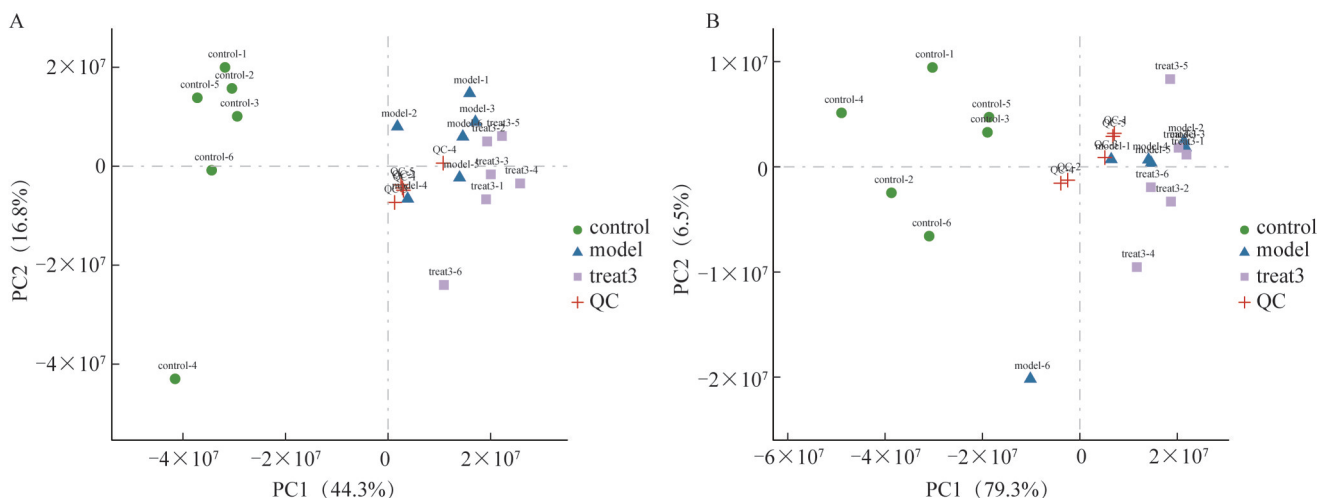


图2 臻通集胶囊给药后大鼠血清总体样本 PCA

3.4 代谢组学分析

3.4.1 差异代谢物的筛选结果 与对照组比较, 模型组共检测出 138 个差异代谢物; 与模型组比较, 臻通集胶囊给药组共检测出 123 个差异代谢物, 正离子模式的 72 个差异代谢物有 24 个在给药后得到了纠正, 负离子模式的 51 个差异代谢物有 9 个在给药后得到了纠正 (表 2、表 3)。其中, 变量重要性投影 (VIP) 值表示变量投影重要度, 值越大, 表示越重要; P 值越小, 表示差异越显著^[8]。

3.4.2 差异代谢物表达差异倍数分析 以差异代谢物的 \log_2FC (FC 为差异倍数) 为横坐标, 显著性差异代谢物为纵坐标, 分析给药组和模型组的差异代谢物表达, 并对差异代谢物进行分类。正离子模式的差

异代谢物主要包括 L -肉碱、甜菜碱、胞苷、 L -脯氨酸肉碱、亚油酸肉碱、 DL -苯丙氨酸、 UDP - D -半乳糖; 负离子模式的差异代谢物主要包括肌苷、替尼泊苷、亮氨酸、 L -谷氨酰胺、 L -缬氨酸、亮氨酸、 D -脯氨酸、甲基丙二酸等。差异代谢物表达差异倍数分析及分类见增强出版附加材料。

3.4.3 差异代谢物的亚类分析 给药组和模型组差异代谢物进行亚类分析, 正离子模式的差异代谢物亚类主要集中在哌啶、脂肪酰基、鞘脂、咪唑、肽模拟物等方面; 负离子模式的差异代谢物亚类主要集中在甘油磷脂、类黄酮、嘌呤核苷酸和香豆素等方面。差异代谢物表达差异火山图及亚类分析图见增强出版附加材料。

表2 臻通集胶囊给药组和模型组在正离子模式下的差异代谢物

编号	名称	VIP值	FC	P值	变化趋势
1	(+)- α -生育酚*	1.151	0.707	0.018	↓
2	1-(1Z-十八烯基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱*	1.815	0.494	0	↓
3	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱*	4.186	1.595	0.034	↑
4	1,5-戊二胺*	1.906	0.744	0.036	↓
5	1-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺*	2.463	0.782	0.045	↓
6	1-棕榈酰-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺*	4.616	0.723	0.005	↓
7	1-棕榈酰磷脂酰胆碱*	1.010	0.818	0.003	↓
8	2-氨基-1-苯乙醇*	4.936	0.649	0	↓
9	2'-脱氧胞苷*	4.607	0.643	0.006	↓
10	2-油酰-1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱*	5.017	1.052	0.039	↑
11	2-哌啶酮	1.547	2.686	0.041	↑
12	4-羟基-L-异亮氨酸	5.410	0.240	0.003	↓
13	腺苷	5.249	2.360	0.002	↑
14	腺苷 2'-磷酸	3.747	0.432	0	↓
15	腺苷 5'-磷酸*	3.409	2.141	0.010	↑
16	丙氨酸-脯氨酸	1.429	0.695	0.022	↓
17	别嘌呤核苷	1.837	1.254	0.048	↑
18	甜菜碱*	13.347	0.842	0.010	↓
19	甜菜碱醛	2.637	0.260	0.002	↓
20	β -烟酰胺-D-核糖核苷酸	1.041	2.989	0.005	↑
21	丁氨酸	2.382	15.338	0	↑
22	胆钙化醇*	2.068	0.400	0.006	↓
23	肌酸酐	2.512	0.800	0.009	↓
24	半胱氨酸-甘氨酸*	2.782	1.695	0	↑
25	胞苷	7.486	0.250	0.002	↓
26	胞苷 3'-磷酸	2.729	0.793	0.001	↓
27	胞苷 5'-二磷酸胆碱	3.487	5.207	0	↑
28	胞嘧啶	4.665	0.445	0	↓
29	脱氧腺苷*	1.387	1.695	0.042	↑
30	DL-谷氨酸	2.044	0.752	0.003	↓
31	DL-吡啶-3-乳酸	2.195	0.615	0	↓
32	DL-苯丙氨酸	3.575	0.669	0	↓
33	呋喃西林	1.519	0.631	0.009	↓
34	谷氨酸-精氨酸	1.930	0.288	0	↓
35	戊二醛	1.267	0.538	0.015	↓
36	谷胱甘肽*	9.518	1.704	0	↑
37	谷氨酸-缬氨酸-精氨酸	1.035	0.487	0.001	↓
38	甘油磷酸胆碱*	28.726	1.552	0	↑
39	次黄嘌呤*	12.276	0.633	0.005	↓
40	酮洛芬- β -D-葡萄糖醛酸苷	1.077	15.024	0.001	↑
41	L-花生四烯酰肉碱*	1.591	2.251	0.017	↑
42	左旋肉碱*	15.271	0.836	0.033	↓
43	还原型L-谷胱甘肽*	13.912	1.667	0.002	↑
44	L-羟基精氨酸	2.328	0.747	0.002	↓

续表2

编号	名称	VIP值	FC	P值	变化趋势
45	油酰肉碱	3.368	2.756	0.015	↑
46	L-蛋氨酸	1.553	0.591	0	↓
47	L-丙酰肉碱*	3.116	1.799	0.005	↑
48	卢西塔尼苷	1.161	34.414	0.002	↑
49	丙二酰-L-肉碱	2.288	0.370	0.019	↓
50	N-(4-氟苯甲酰基)-5-氨基-1H-吡啶	4.039	0.320	0.004	↓
51	N-乙酰甘露糖胺*	2.236	0.719	0.027	↓
52	N-乙酰磺胺甲恶唑	1.518	2.540	0	↑
53	全反式视黄醇脱氢酶	2.509	2.264	0.003	↑
54	烟酰胺*	2.691	0.473	0.016	↓
55	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	1.156	1.744	0.005	↑
56	烟酰胺核苷	1.606	2.577	0	↑
57	油酰左旋肉碱	6.076	3.735	0.037	↑
58	磷脂酰胆碱 (PC, 16:0/16:0)	5.452	1.557	0.020	↑
59	苯乙醛	1.428	0.651	0	↓
60	苯丙氨酸-丝氨酸-精氨酸	1.382	0.631	0.001	↓
61	脯氨酸-脯氨酸	1.688	0.456	0	↓
62	丙二醇丙基醚	1.157	0.259	0.002	↓
63	焦谷氨酸-天冬氨酸	1.409	6.136	0	↑
64	焦谷氨酸-半胱氨酸	1.315	1.612	0.002	↑
65	大黄苷	1.794	19.992	0.002	↑
66	核黄素	2.383	18.028	0.001	↑
67	芝麻素	2.295	16.359	0.001	↑
68	S-甲基-3-硫代对乙酰氨基酚	1.204	2.482	0	↑
69	S-甲基-5'-硫代腺苷	1.717	2.039	0.018	↑
70	鞘磷脂 (d18:1/18:0)	1.954	0.534	0.001	↓
71	尿苷 5'-二磷酸-D-半乳糖	1.653	6.379	0	↑
72	尿苷 5'-二磷酸	1.640	6.311	0	↑

注: *表示给药后得到纠正的代谢物; ↑表示上调; ↓表示下调; 表3同。

表3 臻通集胶囊给药组和模型组在负离子模式下的差异代谢物

编号	名称	VIP值	FC	P值	变化趋势
1	(2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-三羟基-10,13-二甲基-17-[(2R,3R,5R)-2,3,6-三羟基-5,6-二甲基庚-2-基]-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-十氢-1H-环戊[a]菲-6-酮*	2.466	0.310	0	↓
2	β-羟基丙酸	2.104	1.288	0.025	↑
3	β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)	1.356	2.001	0.004	↑
4	1α-甲基-5α-雄甾-3α,17β-二葡萄糖苷酸*	14.462	0.179	0	↓
5	10-羟基-2-癸烯酸	1.017	0.269	0.005	↓
6	11β-羟孕酮	1.379	0.232	0.001	↓
7	16-羟基十六酸	1.842	0.597	0.028	↓
8	1-硬脂酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺*	1.271	1.360	0.021	↑
9	乙酰酪氨酸乙酯	1.001	1.586	0.001	↑
10	腺嘌呤	2.194	1.588	0.020	↑
11	安提帕	2.300	6.251	0.009	↑
12	D-阿拉伯糖	1.877	1.314	0.046	↑

续表3

编号	名称	VIP值	FC	P值	变化趋势
13	D-天冬氨酸	1.067	0.703	0.007	↓
14	脱氢抗坏血酸	4.678	1.318	0.037	↑
15	右旋果糖	4.287	1.528	0.030	↑
16	DL-色氨酸	1.647	0.604	0.001	↓
17	D-来苏糖	1.171	1.336	0.041	↑
18	D-脯氨酸	1.467	0.612	0	↓
19	D-核糖 1-磷酸	2.435	1.784	0.003	↑
20	肠抑制素	1.418	0.686	0.004	↓
21	脂肪酸 (Fa 18 : 1+1o)	1.040	0.629	0.002	↓
22	灵芝酸A	2.860	0.455	0.004	↓
23	谷氨酸*	3.081	0.688	0.002	↓
24	甘油 3-磷酸酯*	3.309	1.975	0	↑
25	吡啶乙酸	1.393	0.536	0.026	↓
26	肌苷	5.701	1.516	0.003	↑
27	亮氨酸*	7.562	0.607	0	↓
28	左旋谷氨酰胺	1.547	3.673	0.017	↑
29	L-缬氨酸	1.740	0.653	0	↓
30	苹果酸盐	5.642	0.647	0.003	↓
31	马来酸	1.164	0.321	0.041	↓
32	[6-羟基-1-[2-(4-吗啉基)乙基]-1H-吡啶-3-基]-1-萘基	1.017	0.510	0.007	↓
33	甲基丙二酸	1.928	1.506	0.028	↑
34	N-乙酰-D-氨基葡萄糖 6-磷酸酯	1.602	0.723	0.040	↓
35	顺式-9,10-环氧硬脂酸*	4.089	0.572	0.019	↓
36	诺卡胺素	5.813	0.487	0.001	↓
37	泛酸盐	3.493	0.511	0.004	↓
38	PC (34 : 3)	1.746	1.583	0.040	↑
39	PC (16 : 1e/8,9-epete)	1.640	1.605	0.019	↑
40	PC (18 : 1e/8-hepe)	1.467	1.374	0.029	↑
41	苯基丙氨酸*	3.801	0.594	0.016	↑
42	磷酸烯醇丙酮酸盐	1.158	0.377	0.018	↑
43	磷脂酰肌醇 (PI, 34 : 2) *	1.199	1.311	0.042	↑
44	PI (18 : 0/8,9-ect)	1.238	2.413	0.005	↑
45	sn-甘油 3-磷酸乙醇胺	4.286	1.295	0.020	↑
46	替尼泊苷	1.097	19.387	0	↑
47	尿苷二磷酸右旋葡萄糖	5.373	12.227	0	↑
48	己酰糖胺	8.241	9.112	0	↑
49	尿嘧啶	8.967	0.288	0	↓
50	尿酸	1.653	1.972	0.009	↑
51	尿苷 5'-磷酸	1.404	2.660	0	↑

3.4.4 差异代谢物生物信息学分析

3.4.4.1 聚类分析 显著性差异代谢物 (VIP值>1, $P<0.05$) 的层次聚类分析结果显示, 聚在同一簇内的代谢物具有相似的表达模式, 可能具有相似的功能或者共同参与同一代谢过程和细胞通路。正离子

模式的差异代谢物主要聚集在腺苷 5-单磷酸、还原型甘油磷酸胆碱、脱氧腺苷、半胱氨酸-甘氨酸、L-谷胱甘肽等方面, 负离子模式的差异代谢物主要聚集在L-谷氨酰胺、尿酸、腺嘌呤、抗坏血酸、谷氨酸、D-脯氨酸等方面。显著差异代谢物的层次聚类

分析图见增强出版附加材料。

3.4.4.2 相关性分析 对显著性差异代谢物间的代谢密切程度进行相关性分析。正、负离子模式均集中在脂质、核酸、有机酸及其衍生物、有机氮化合物、有机氧化合物等方面。显著性差异代谢物的相关性网络图见增强出版附加材料。

3.4.4.3 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路注释与分析 将正、负离子模式筛选到的差异代谢物合并, 对其进行KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 通路注释与分析, 见图3。然后对KEGG代谢通路整体变化进行差异丰度得分分析, 见图4。涉及的代谢通路包括雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路、环磷酸鸟苷酸依赖性蛋白激酶 (cGMP-PKG) 信号通路、叉头转录因子 (FoxO) 信号通路、蛋白质消化和吸收、嘧啶代谢、微生物消化和吸收、甘油磷脂代谢、氨基酸生物合成、嘌呤代谢等。

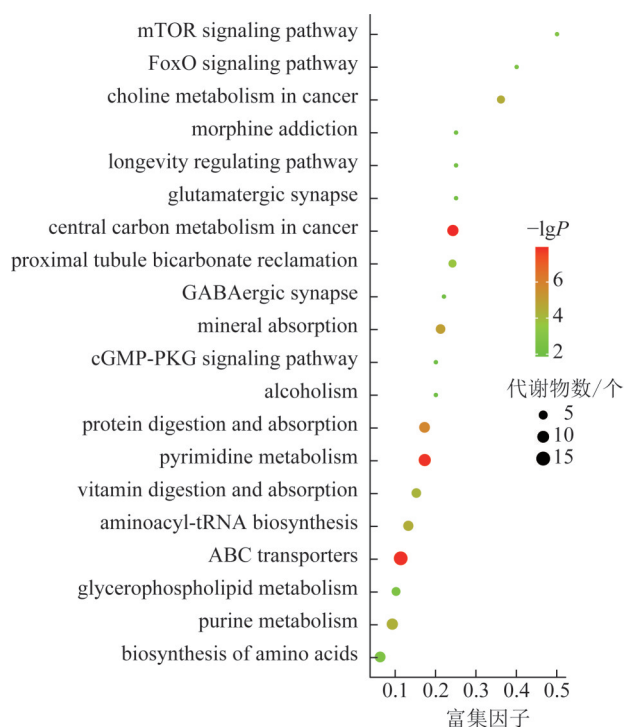


图3 臻通集胶囊给药组和模型组大鼠血清中差异代谢物 KEGG 通路富集分析

4 讨论

代谢组学主要通过特定细胞、器官或生物体中的低相对分子质量代谢物 (<2000) 进行定量分析, 是1999年由Nicholson等^[9]提出, 主要用来研究生物体受刺激后所发生的各种代谢应答变化, 可以直观反映机体的代谢状况。目前, 代谢组学最常用

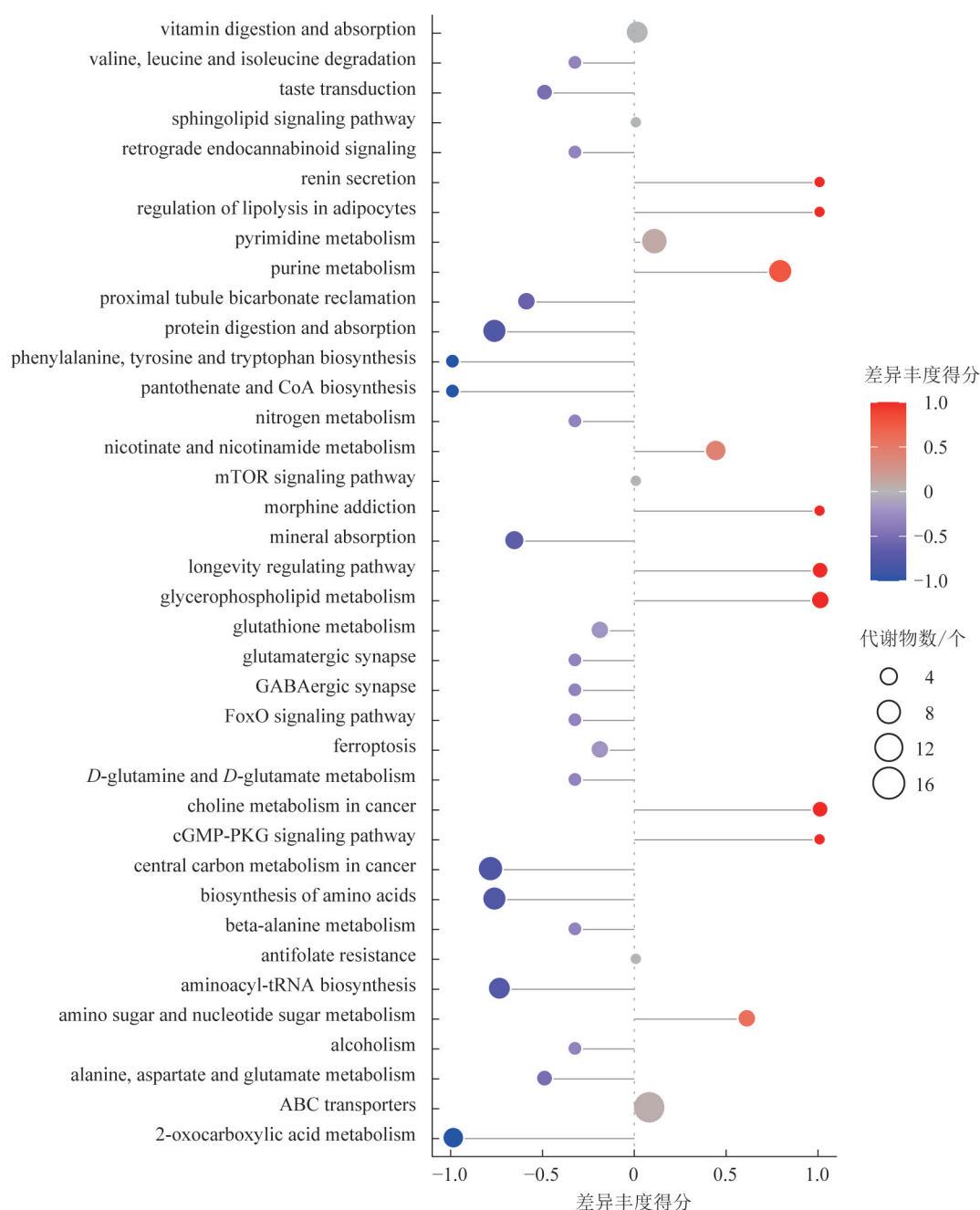
的判别归类分析方法包括以PCA为主的无监督的判别分析方法及以偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 为主的有监督的判别分析方法^[10]。

本研究中, 模型组大鼠血清中的TG、TC、HDL-C和LDL-C较对照组均明显升高, 且PCA显示, 对照组和模型组分离明显, 说明模型成功。而臻通集胶囊给药后, 高剂量和中剂量组的TG、TC、LDL-C, 高剂量组的HDL-C较模型组明显降低, 且差异有统计学意义。中剂量为臻通集的有效剂量, 在此基础上, 比较了模型组和臻通集中剂组的代谢组学差异。

前期进行了实验方法学的考察, QC样本间的相关性系数均大于0.9, 且QC样本均在置信区间内, 表明实验的重复性较好。PCA显示, 经臻通集胶囊给药后, 各组均向对照组方向回调, 说明臻通集胶囊对高脂血症具有良好的干预作用, 与上述血脂水平变化相一致。与对照组比较, 模型组共检测出138个差异代谢物, 其中正离子模式有66个差异代谢物, 负离子模式有72个差异代谢物。给药组与模型组比较, 共检出123个差异代谢物, 其中正离子模式有72个差异代谢物, 主要包括甘油磷酸胆碱、氨基酸、腺苷、谷胱甘肽、磷酸胆碱、胞嘧啶、乳酸、1-花生四烯酰肉碱等; 负离子模式有51个差异代谢物, 主要包括尿嘧啶、氨基酸、谷氨酸、尿酸、吡啶乳酸、腺嘌呤等。上述差异代谢物主要集中在木脂素、新木脂素及相关化合物, 羧酸及其衍生物, 肉桂酸和衍生物, 香豆素及其衍生物, 吡啶类衍生物, 异黄酮, 木脂素内酯, 有机磷酸和衍生物等。

经生物信息学分析, 臻通集干预大鼠高脂血症的代谢过程涉及多个信号通路, 主要包括mTOR信号通路、cGMP-PKG信号通路、FoxO信号通路、蛋白质消化和吸收、嘧啶代谢、微生物消化和吸收、甘油磷脂代谢、氨基酸生物合成、嘌呤代谢等。这与臻通集含有银杏叶提取物、葛根提取物、余甘子提取物等多个调脂成分密切相关^[11-12]。

磷脂腺肌醇3-激酶 (PI3K) - 蛋白激酶B (Akt) - mTOR信号通路是典型的自噬通路, 该通路通过调节蛋白质合成和降解、改善细胞能量代谢等多种途径发挥重要的生理功能, 激活该通路可增强肝脏细胞的自噬表达, 能够有效调节血脂、改善肝脏脂质沉积等^[13-14]。FoxO1是位于PI3K/Akt下游的关键因子, 在肝脏糖脂代谢的调节中具有至关重要的



注：差异丰度得分（DA score）为代谢途径中所有代谢物的整体变化；得分1表示该通路中所有鉴定到的代谢物表达趋势上调，-1表示该通路中所有鉴定到的代谢物表达趋势下调；线段的长度表示差异丰度得分的绝对值，线段端点的圆点大小表示该通路中代谢物的数目多少，点越大表示代谢物数目越多；线段和圆点颜色的深浅和差异丰度得分成比例，红色越深，表示该通路整体表达情况越倾向于上调，蓝色越深，表示该通路整体表达情况越倾向于下调。

图4 臻通集胶囊给药组和模型组大鼠血清中差异代谢物代谢通路的差异丰度得分

地位。研究表明，通过调节PI3K/Akt通路，促进FoxO1磷酸化，能够调节血脂水平，缓解高脂血症^[15-18]。文献报道，次黄嘌呤异构体别嘌呤醇能够改善患者高尿酸血症，利于改善患者的血脂代谢情况^[19]。李玉红等^[20]研究发现，糖脂清可以改善四氧嘧啶糖尿病小鼠的生长状况，降低小鼠空腹血糖浓

度和血清中TG的含量，提示嘧啶代谢参与血脂水平的调节。

综上，臻通集胶囊能够有效改善高脂血症大鼠的血脂水平，与其能够调节嘌呤代谢、嘧啶代谢、甘油磷脂代谢、mTOR信号通路，cGMP-PKG信号通路等密切相关。

参考文献

- [1] 赵冬,刘静,吴兆苏. 中国心血管病流行病学发展历史和重要研究概述[J]. 中华心血管病杂志,2021,49(12):1171-1177.
- [2] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告2020[J]. 心肺血管病杂志,2021,40(9):885-889.
- [3] 钟志莲,李年生. 银杏叶提取物对大鼠高脂血症的影响[J]. 中国民族民间医药,2009,18(16):26-27.
- [4] 阚晓月. 葛根多糖降血脂活性及其脂质体的制备研究[D]. 镇江:江苏大学,2019.
- [5] 何晓敏. 余甘子药理作用研究进展[J]. 中国中医药科技,2014,21(5):593-595.
- [6] 侯红平,王彩霞,彭博等. 臻通集胶囊对高脂血症模型大鼠的治疗作用及其机制研究[J]. 中医药导报,2022,28(9):14-18.
- [7] SISKOS A P, JAIN P, RÖMISCH-MARGL W, et al. Interlaboratory reproducibility of a targeted metabolomics platform for analysis of human serum and plasma [J]. Anal Chem, 2017, 89(1):656-665.
- [8] 高健,杨更亮,杨洪军,等. 代谢指纹图谱分析及数据处理方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2519-2523.
- [9] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11):1181-1189.
- [10] TRYGG J, HOLMES E, LUNDSTEDT T. Chemometrics in metabolomics [J]. J Proteome Res, 2007, 6(2):469-479.
- [11] 漆宇珊,胡一鸿,金晨钟,等. 玉竹多糖对高脂膳食小鼠糖脂代谢调节作用的研究[J]. 湖南农业科学,2016(11):27-30.
- [12] 苗军,张馨木,孙波,等. 银杏叶提取物对实验性高脂血症血脂代谢的影响及抗氧化作用[J]. 中国老年学杂志,2006,26(11):1544-1545.
- [13] 刘晶晶. 化痰祛痰方对FFA诱导HepG2细胞脂质沉积的影响及机制研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [14] 刘晶晶,贾连群,杨关林,等. 化痰祛痰方通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路减轻油酸和棕榈酸引起的HepG2细胞脂质沉积[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2017,33(8):1097-1101.
- [15] 王杰,宋因,陈丝,等. 基于肠道菌群调控TMAO/PERK/FOXO1途径探讨香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠肝脏甘油三酯合成的影响及机制[J]. 时珍国医国药,2022,33(2):286-291.
- [16] 花卫成,付鹏宇,张纛,等. 运动经FoxO1-脂噬通路缓解ApoE^{-/-}小鼠高脂血症的研究[J]. 中国实验动物学报,2021,29(6):808-815.
- [17] 蔡莹,李勇男. EGCG改善高胆固醇血症大鼠胆固醇合成及对SIRT1/FOXO1通路表达的影响[J]. 解剖科学进展,2018,24(2):113-117.
- [18] ZHANG K B, LI L, QI Y J, et al. Hepatic suppression of Foxo1 and Foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice [J]. Endocrinology, 2012, 153(2):631-646.
- [19] 勾威,申丽盈,王钊,等. 别嘌醇治疗动脉粥样硬化伴尿酸血症对血脂代谢及肝肾功能的影响[J]. 贵州医药,2018,42(6):678-679.
- [20] 李玉红,张德芹,刘虹,等. 糖脂清对四氧嘧啶糖尿病小鼠糖、脂代谢的影响[J]. 天津中医药大学学报,2009,28(4):185-187.

(收稿日期:2022-07-12 编辑:田苗)