

· 论著 ·

基于 LC-MS 技术的二氢丹参酮 I 抗肝纤维化肝脏代谢组学研究

陶朝阳¹, 朱臻宇², 邢心睿², 曹 奇², 王 辉² (1. 西藏军区总医院药物制剂研究中心, 西藏 拉萨 850071; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

【摘要】 目的 利用肝脏代谢组学方法监测肝纤维化相关的代谢变化, 评价二氢丹参酮 I 治疗肝纤维化的药效及作用机制。**方法** 将 28 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常组、肝纤维化模型组和二氢丹参酮 I 低剂量组、二氢丹参酮 I 高剂量组。采用硫代乙酰胺诱导肝纤维化模型, 给予 4 周治疗后, 取大鼠肝脏进行液相色谱-质谱分析, 结合 OPLS-DA 模式识别方法筛选模型组和正常组之间的差异代谢物, 并以此评价二氢丹参酮 I 对肝纤维化的治疗作用。**结果** 通过肝脏代谢组学分析鉴定了 38 种肝纤维化相关的生物标志物, 涉及谷胱甘肽代谢、褪黑素代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、三羧酸循环等代谢通路, 同时数据显示二氢丹参酮 I 的干预对肝纤维化有改善作用。**结论** 二氢丹参酮 I 能够通过调节失衡的谷胱甘肽代谢、褪黑素代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、三羧酸循环等途径而发挥预防和治疗肝纤维化作用。

【关键词】 肝纤维化; 二氢丹参酮 I; 液相色谱-质谱联用; 代谢组学

【中图分类号】 R284.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2021)05-0403-06

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202101035

Metabolomics study of dihydrotanshinone I on hepatic fibrosis with LC-MS technology

TAO Chaoyang¹, ZHU Zhenyu², XING Xinrui², CAO Qi², WANG Hui² (1. Research Center of Pharmaceutical Preparation, Tibet Military General Hospital, Lhasa 8500771, China; 2. Department of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To evaluate therapeutic effects of dihydrotanshinone I on hepatic fibrosis based on liver metabolomics method. **Methods** 28 rats were randomly divided into four groups including control group, hepatic fibrosis model group and dihydrotanshinone I low dose group and dihydrotanshinone I high dose group. The dihydrotanshinone I treated groups received dihydrotanshinone I for 28 days. The rat liver samples were collected and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS). The OPLS-DA pattern recognition analysis of metabolomics differences among the groups and therapeutic effects of dihydrotanshinone I on hepatic fibrosis were evaluated. **Results** 38 metabolites were identified through liver metabolomics analysis. The possible mechanism of hepatic fibrosis was mainly involved glutathione metabolism, melatonin metabolism, amino acid metabolism, lipid metabolism and TCA cycle. The hepatic fibrosis induced by TAA was reversed by dihydrotanshinone I. **Conclusion** Dihydrotanshinone I provided satisfactory therapeutical effects on hepatic fibrosis through partially regulating the perturbed glutathione metabolism, melatonin metabolism, amino acid metabolism, lipid metabolism, TCA cycle.

【Key words】 hepatic fibrosis; dihydrotanshinone I; LC-MS; metabolomics

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是以肝内细胞外基质(extracellular matrix protein, ECM)过度沉积和纤维瘢痕形成成为特征的慢性肝病,在世界范围内具有较高的发病率和病死率,持续发展导致肝硬化、肝癌的发生^[1]。肝纤维化发病机制复杂,病毒

性肝炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、胆汁淤积性肝病等均可能导致慢性肝炎症,并最终导致肝纤维化^[2]。然而,除肝移植外,目前尚无有效治疗肝纤维化的方法,针对肝纤维化早期识别和治疗对于预防相关负面后果至关重要。鉴于肝脏是人体最大的器官和主要代谢枢纽,探讨肝纤维化的代谢特征有望发现新的标志物和治疗靶点。

二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I, DHI)是中药丹参中的亲脂性成分,被认为是一种潜在的治疗肝纤维化的药物,其肝脏保护作用、抗癌作用、抗

【基金项目】 国家自然科学基金(81773683)

【作者简介】 陶朝阳,主管药师,研究方向:天然药物化学及制剂研发, Tel: (089)16858350, Email: taozhaoyang73@163.com

【通信作者】 王 辉, 硕士, 讲师, 研究方向: 药物分析学, Tel: (021)81871336, Email: wanghuiuh@163.com

流感活性、抗炎作用等生物学功能已多次报道^[3-5]。在本课题组前期扶正化癥方抗肝纤维化机制研究中发现 DHI 是扶正化癥胶囊的重要药效物质基础,也在细胞活性实验中证明其能显著抑制细胞活性发挥抗肝纤维化作用^[6]。然而,DHI 对肝纤维化治疗作用的体内药效及机制尚不明确。本研究利用肝脏代谢组学方法研究肝纤维化密切相关的生物标志物,探索肝纤维化相关病理过程,同时采用 DHI 进行干预,研究其对肝纤维化的治疗作用及作用机制,为肝纤维化早期诊断、有效治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

METTLER AE240 型电子天平(瑞士梅特勒公司);FRESCO17 台式冷冻离心机(Thermo Fisher, 美国);DZG-6020 真空干燥箱(上海益恒实验仪器有限公司);Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪、Agilent 6538 Q-TOF/MS 质谱仪、Micro17 高速离心机(Thermo Fisher Scientific, 美国);HSS T₃ 柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm)(Waters, 美国)。

1.2 试剂

DHI(纯度 98%,上海一飞生物科技有限公司);硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA, 东京化成工业株式会社);甲醇、乙腈(均为色谱纯,德国 Merck 公司),甲酸(色谱纯,ROE scientific INC, 美国);水为实验室制备的超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雄性,质量(200~250 g),共 28 只,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号:SCXK(沪)2012-0002。饲养于海军军医大学实验动物中心,遵循动物实验的标准操作规范。饲养条件:温度(22±2)℃,相对湿度 40%~60%,12 h 昼夜交替循环的条件下笼养。

2 方法

2.1 动物模型的构建和治疗

将 28 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:正常组、肝纤维化模型组、DHI 低剂量组和 DHI 高剂量组,每组 7 只。24 h 适应性饲养后,除正常组外,模型组及不同用药剂量干预组每周 3 次腹腔注射 200 mg/kg TAA,持续给 TAA 造模 8 周;同时,自第 5 周起,按照给药剂量持续给药 4 周:正常组、模型组,每日给予生理盐水 10 ml/kg;DHI 低剂量组,每日给予

DHI 15 mg/kg;DHI 高剂量组,每日给予 30 mg/kg。

2.2 样品收集

最后一次给药 24 h 后,采用脊椎脱臼法处死大鼠。快速切除肝脏后,用 0℃ 生理盐水冲洗并立即放于液氮中快速冷冻,储存于-80℃ 冰箱直至分析。

2.3 样品制备

将冻存的肝脏组织置于室温自然解冻,取约 100 mg 肝脏样本于匀浆管中,加入 800 μl 甲醇,在 60 Hz 下充分匀浆至没有纤维颗粒,4℃ 离心 15 min (14 500×g)后取上清液置于 1.5 ml 的离心管中,氮气吹干。在上述氮气吹干的样品残渣中加入 300 μl 含内标甲醇涡旋 30 s(内标为 L-2-氯苯丙氨酸,浓度为 5 μg/ml),每个样品取 10 μl 混匀作为质量控制样品。

2.4 LC-MS 分析

色谱条件:Agilent 1290 Infinity UHPLC, 色谱柱:Waters XSelect HSS T₃ column 色谱柱,柱温:30℃;进样量:3 μl;流动相 A:含 0.1% 甲酸的水,流动相 B:含 0.1% 甲酸的乙腈。流速:0.4 ml/min;梯度洗脱条件:0~2 min, 2%B, 2~17 min, 2%~98%B, 17~19 min, 98%B。质谱条件:Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF/MS, 离子源:电喷雾(ESI)离子源,正、负离子检测模式;干燥气温度:350℃,干燥气体流量:11 L/min;碎裂电压:120 V;毛细管电压:4 000 V(ESI+)/3 500 V(ESI-);质谱扫描范围:50~1 500 m/z。

2.5 数据分析

2.5.1 数据处理

将采集的质谱数据转换为 mzData 格式文件,然后通过 R 软件 XCMS 程序将质谱数据转化为含有保留时间、质核比、峰强度的数据矩阵。保留频数超过 80% 的质核比数据,并对所有峰面积以内标峰面积和肝组织质量进行归一化处理。

2.5.2 差异代谢物筛选

将上述获得的二维矩阵列表导入 SIMCA 14.1 软件中进行多元统计分析,采用正交偏最小二乘判别分析研究各组间差异,并得到变量 VIP 值。正常组和模型组间比较采用独立样本 t 检验,采用 VIP>1,且选择差异具有显著性(P<0.05)的变量作为潜在的差异代谢物,然后检索数据库(HMDB、METLIN、KEGG 数据库),筛选出潜在的差异代谢物。

2.5.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 统计软件进行数据统计分析,

组间数据采用单因素方差分析(ANOVA),两组样本分析采用独立样本 t 检验,分析数据差异的统计学意义,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基于 LC-MS 的肝组织代谢轮廓分析

本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 在正、负两种模式下对肝组织进行代谢组学分析,两种模式下典型的总离子流图见图 1。代谢组学数据的稳定性、重现性对研究的可靠性非常重要,为考察实验的系统稳定性,本研究从每个肝组织样品中取 10 μ l 混匀后作为质量控制样品。在样品序列一开始连续进样 10 针 QC 样品,并按每 7 个样品再进样一针,共进样 14 次。正、负离子模式下,QC 样品均显示良好的聚集状况,证明该分析系统稳定可靠。

3.2 多变量统计分析

经过数据处理后,LC-MS 数据集在正离子模式下得到 368 个离子,在负离子模式下得到 249 个

离子。根据 OPLS-DA 方法对数据进行分析,OPLS-DA 是一种多因变量对多自变量的回归建模方法,最大特点是可以去除自变量和分类变量无关的分类变异,根据得分图可以揭示数据离散程度,发现异常值^[7]。在得分图上具有相似的代谢物组成的样本,处在比较相似的位置,样本间距越远代表代谢物差异越大,样本间生理状态相差越大。将正常组、模型组、DHI 低剂量组和 DHI 高剂量组的 LC-MS 数据导入到 SIMCA 进行分析,其得分如图 2A、2B 所示,正常组与模型组样本各自聚为一类,并且完全分离,说明肝纤维化大鼠模型的肝组织代谢轮廓发生显著改变,代谢物的种类或水平发生了明显变化。DHI 给药组(DHI 低剂量组、DHI 高剂量组)能够与模型组明显区分,并向正常组靠近,表明 DHI 给药组可恢复部分代谢物至正常水平。

3.3 差异代谢物的筛选

OPLS-DA 可用于寻找导致聚类间显著差异的变量,筛选正常组和肝纤维化大鼠模型组间潜在的

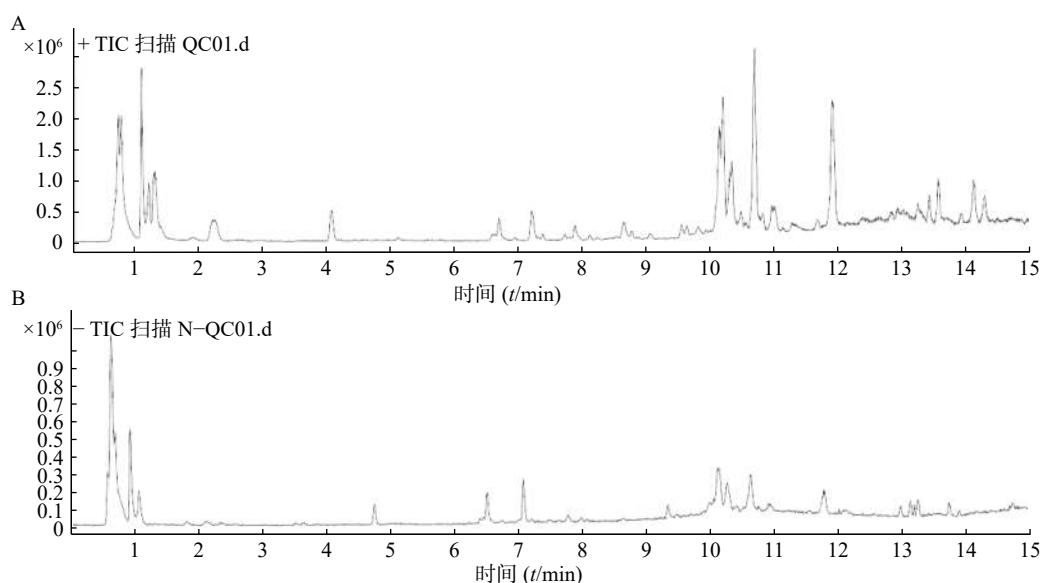


图 1 肝脏正负离子模式下典型的 LC-MS 总离子流图

A. 正离子模式; B. 负离子模式

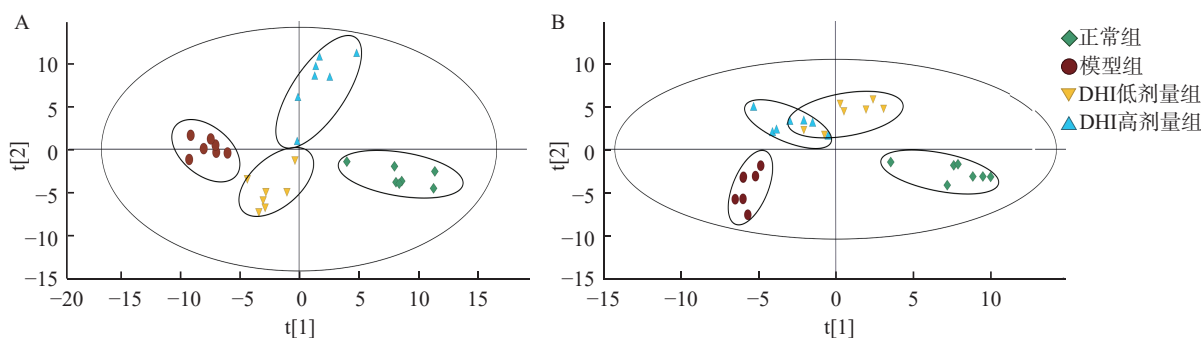


图 2 基于 LC-MS 正负离子模式下的 OPLS-DA 分析得分图

A. 正离子模式; B. 负离子模式

差异代谢物。基于 OPLS-DA 模式下 VIP>1 筛选两组间的差异代谢物, 进行 t 检验后, 筛出模型组和正常组间差异具有显著性的变量($P<0.05$)。基于 VIP 和 t 检验以及 HMDB 和 KEGG 等数据库比

对, 筛选出 38 个与 TAA 诱导肝纤维化大鼠模型相关的较为重要的差异代谢物作为潜在生物标志物(表 1)。通过 KEGG、HMDB 等数据库查询, 我们发现这些代谢物主要涉及谷胱甘肽代谢、褪黑素代

表 1 TAA 诱导肝纤维化相关的差异代谢物及其代谢通路

编号	代谢物	精确分子量	加合离子	分子式	调节趋势	相关通路
1	丁二酸	118.026 6	M-H	C ₄ H ₆ O ₄	↓*	TCA 循环
2	柠檬酸	130.026 6	M+NH ₄	C ₅ H ₆ O ₄	↑**	脂肪酸代谢
3	戊二酸	130.026 6	M+FA-H	C ₅ H ₆ O ₄	↓***	/
4	L-天冬氨酸	133.037 5	M-H	C ₄ H ₇ NO ₄	↑*	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
5	丝氨酸甘氨酸	162.064 1	M+H-H ₂ O	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₄	↑*	二肽
6	左旋肉碱	162.113 0	M+H	C ₇ H ₁₆ NO ₃	↓**	肉碱合成
7	2-甲基-3-苯基丙酸	164.083 7	M+H-H ₂ O	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	↑***	/
8	顺乌头酸	174.016 4	M-H	C ₆ H ₆ O ₆	↓**	三羧酸循环
9	半胱氨酰甘氨酸	178.041 2	M+H	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	↓***	谷胱甘肽代谢
10	缬氨冬酰胺	231.121 9	M+NH ₄	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	↓*	二肽
11	尿苷	244.069 5	M-H	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	↓**	嘧啶代谢
12	甘油磷酸甘油	246.050 5	M-H	C ₆ H ₁₅ O ₈ P	↓**	脂质代谢
13	环状6-羟基褪黑素	246.100 4	M+Na	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	↓**	褪黑素代谢
14	7,8-二氢蝶呤	255.096 8	M+H	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	↓*	蝶呤生物合成
15	谷氨酰胺天冬酰胺	261.096 1	M+Na	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₆	↑***	二肽
16	γ-谷氨酰鸟氨酸	261.132 5	M+NH ₄	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O ₅	↑***	二肽
17	3-羟基异戊酰肉碱	261.157 6	M+NH ₄	C ₁₂ H ₂₃ NO ₅	↓***	脂肪酸代谢
18	天冬氨酰谷氨酸	262.080 1	M+FA-H	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇	↓***	二肽
19	N-乙酰5-羟色胺硫酸盐	298.062 3	M-H ₂ O-H	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	↓***	褪黑素代谢
20	视黄酯	302.224 6	M-H	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	↓*	脂肪酸代谢
21	谷胱甘肽	307.083 8	M+H	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	↓**	谷胱甘肽代谢
22	吡啶酚葡萄糖醛酸苷	309.084 9	M+H	C ₁₄ H ₁₅ NO ₇	↓**	脂质代谢
23	3'-AMP	347.063 1	M+H	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	↓*	胆酸生物合成
24	苯酰甘氨酸	397.355 6	M+Na	C ₂₄ H ₄₇ NO ₃	↑*	脂肪酸代谢
25	花生四烯酰肉碱	448.342 1	M+H	C ₂₇ H ₄₆ NO ₄	↓**	脂质代谢
26	花生四烯基肉碱	455.397 5	M+H-H ₂ O	C ₂₇ H ₅₃ NO ₄	↑**	脂肪酸代谢
27	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/18:2(9Z,12Z))	477.285 5	M+H	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	↓*	甘油磷脂代谢
28	溶血磷脂酰乙醇胺(18:2(9Z,12Z)/0:0)	477.285 5	M-H	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	↓*	甘油磷脂代谢
29	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	499.269 9	M+FA-H	C ₂₅ H ₄₂ NO ₇ P	↓*	甘油磷脂代谢
30	牛磺熊去氧胆酸	499.296 8	M-H	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	↓*	脂质代谢
31	溶血磷脂酰乙醇胺(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	501.285 5	M+H	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	↓*	甘油磷脂代谢
32	二酰甘油(16:1n7/0:0/18:3n3)	588.475 4	M+H-H ₂ O	C ₃₇ H ₆₄ O ₅	↑***	脂质代谢
33	二酰甘油(14:0/0:0/22:5n3)	614.491 0	M+H	C ₃₉ H ₆₆ O ₅	↑***	脂质代谢
34	磷脂神经酰胺(d18:1/16:0)	617.478 4	M+H-H ₂ O	C ₃₄ H ₆₈ NO ₆ P	↑***	鞘脂代谢
35	鞘糖脂(d18:1/12:0)	643.502 3	M+H	C ₃₆ H ₆₉ NO ₈	↑***	磷脂代谢
36	磷脂酰乙醇胺(16:0/P-16:0)	675.520 3	M+H-H ₂ O	C ₃₇ H ₇₄ NO ₇ P	↑**	磷脂代谢
37	磷脂酰乙醇胺(18:0/15:0)	705.530 9	M+H-H ₂ O	C ₃₈ H ₇₆ NO ₈ P	↑***	磷脂代谢
38	心磷脂(i-13:0/i-22:0/i-12:0/i-13:0)	1 296.909 6	M+H-H ₂ O	C ₆₉ H ₁₃₄ O ₁₇ P ₂	↓*	磷脂代谢

* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$, 模型组与正常组比较

谢、氨基酸代谢、脂质代谢、三羧酸循环等途径。

3.4 DHI 的干预治疗

以肝纤维化相关的差异代谢物的相对含量作为检测指标可以评价 DHI 对肝纤维化的治疗作

用,比较发现 33 种代谢物的含量发生明显逆转(图 3),同时,有 14 种代谢物的含量回调与 DHI 的剂量成正相关性,即高剂量组比低剂量组回调更多(图 3A、3B)。

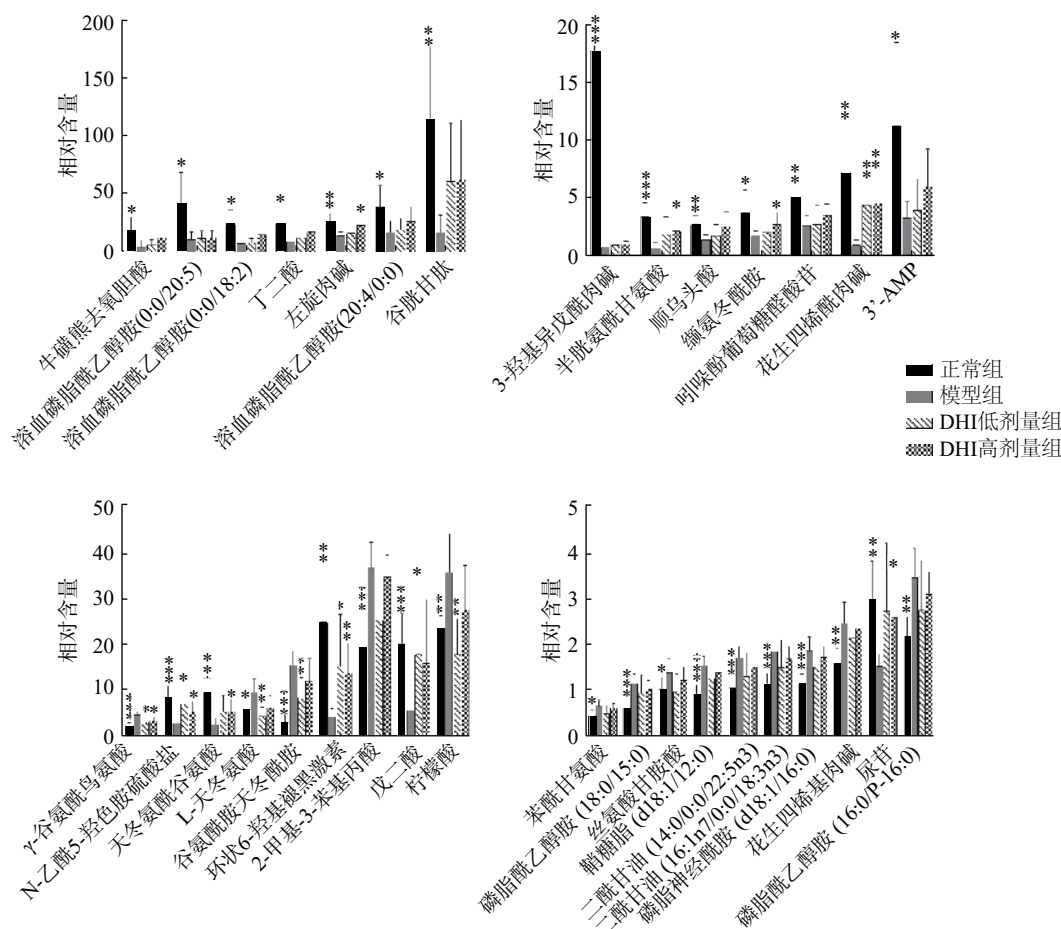


图 3 33 种潜在标志物在正常组、肝纤维化模型组、DHI 给药组中的相对含量变化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与模型组比较

4 讨论

4.1 研究意义

肝纤维化是一种发病机制复杂,可导致肝硬化、肝衰竭甚至肝癌等严重肝脏疾病的慢性流行肝病,然而目前并没有药物可以治疗肝纤维化,中药及其活性成分由于其多靶点、多通路等特点被认为是肝纤维化治疗的潜在药物。代谢组学可以对生物体内小分子代谢产物进行动态分析,通过分析阐述代谢物与生理病理变化间的联系,对肝纤维化的机制进一步阐述,也能通过肝纤维化相关差异代谢物的含量相对变化分析药物对肝纤维化模型的药效作用。本研究用肝脏代谢组学方法分析了与 TAA 诱导的肝纤维化模型密切相关的 38 种代谢物,主要涉及谷胱甘肽代谢、褪黑素代谢、氨基酸代谢、

脂质代谢、三羧酸循环等途径, DHI 能够通过调节部分代谢通路发挥预防和治疗肝纤维化作用。

4.2 谷胱甘肽代谢

肝纤维化的产生伴随着肝细胞死亡和肝星状细胞(HSCs)的活化, HSCs 约占正常人肝脏中非实质细胞的 1/3 和总驻留细胞的 15%, HSCs 从静态到激活会使得 ECM 过剩表达而导致纤维化,而氧化应激在 HSCs 激活和 ECM 形成中发挥重要的促进作用^[1,8]。谷胱甘肽(GSH)是人体内含量最丰富的抗氧化剂,也是体内氧化防御体系的主要组成成分之一^[9]。GSH 可以在谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽-S-转移酶以及谷胱甘肽还原酶的作用下与其氧化态相互转换,清除部分有机过氧化物,调节体内的氧化还原稳态,缓解氧化应激对组织造成的损伤^[10-11]。有研究表明,在对乙酰氨基酚、四氯化

碳、重金属砷等诱导下,大鼠肝组织中 GSH 含量下降^[12]。本研究中, TAA 诱导的肝纤维化大鼠模型肝组织中 GSH 显著下降,这与谷胱甘肽在其他肝损模型中下调的趋势一致。经过 DHI 干预后 GSH 回调,且高剂量 DHI 比低剂量组回调比例更大,这说明 DHI 可能调整体内谷胱甘肽代谢通路,通过提高体内谷胱甘肽含量恢复肝组织抗氧化功能,缓解氧化应激对肝脏的进一步损伤,从而起到抗肝纤维化作用。

4.3 褪黑素代谢

肝纤维化过程中,抑制 HSC 的激活和增殖是预防和治疗肝纤维的重要途径。血小板衍生生长因子 (PDGF) 可以激活 JAK2/STAT3 信号通路,致使 HSC 增殖,并抑制 HSC 凋亡^[13]。已有研究证明,褪黑素通过抑制 JAK2/STAT3 相关信号通路或抗氧化机制来抑制 HSC 的激活和增殖从而发挥肝脏保护作用^[14-15]。在本研究中,环 6-羟基褪黑素及 N-乙酰血清素硫酸盐均为褪黑素代谢产物,在模型组中含量显著增加,说明褪黑素被大量代谢,肝脏保护作用被抑制。经过 DHI 的干预后两种褪黑素代谢产物均回调,这提示 DHI 可能通过调整褪黑素代谢,回调褪黑素及其代谢产物的机体内含量发挥抗肝纤维化活性。

4.4 氨基酸代谢

肝脏是机体物质代谢的中枢器官,在氨基酸的新陈代谢和蛋白质的合成与分解中发挥重要作用。天冬氨酸是一种酸性氨基酸。天冬氨酸在哺乳动物中一般被认为是一种营养上非必需的氨基酸。然而,越来越多的文献表明,天冬氨酸在包括肝脏生理学在内的许多生物和生理过程中起着重要作用,如合成精氨酸以维持巨噬细胞应对免疫挑战,同时,也有证据表明天冬氨酸可以减轻肝损伤、增强肝脏功能^[16]。本研究发现 TAA 诱导大鼠肝纤维化后,与正常组比较,模型组中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路被干扰, L-天冬氨酸含量显著变化,经过 DHI 的干预后回调,这提示 DHI 可能调整丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路,改变体内天冬氨酸含量发挥肝保护作用。

4.5 脂质代谢

脂质不仅是细胞膜的组成成分,而且参与信号转导。磷脂酰胆碱、鞘脂、溶血性磷脂酰胆碱是血清脂蛋白和细胞膜的重要组成成分。溶血磷脂酰乙醇胺是磷脂酶 A₁ 水解磷脂酰乙醇胺 (PE) 失去一分子脂肪酸生成的产物,作为一种溶血卵磷脂,在肝脏中与卵磷脂一起在线粒体间进行转移^[17]。

有研究证明, PE 通过 N-甲基转移酶生成 PC 的通路约占 PC 产生量的 30%, 磷脂酰胆碱为肝脏重要营养来源,可以拮抗肝脏受病毒、药物、酒精及其他有毒物质的侵害,防止肝纤维化^[9]。肝脏是脂质生成和脂肪酸氧化等脂类代谢的主要场所,肝纤维化时可以引起脂质合成、转运及分解代谢的普遍紊乱,而脂质代谢异常又会加重肝损害,引起肝脏的脂毒性^[18]。在本研究中,4 种 LysoPE 在模型组中均发生下降,另外一些磷脂代谢相关物质,如 GlcCer(d18:1/12:0)、PE(16:0/P-16:0)、PE(18:0/15:0)、CL(i-13:0/i-22:0/i-12:0/i-13:0) 和脂质代谢相关物质如二酰甘油 (DG)、甘油磷酸甘油、牛磺酸熊去氧胆酸等在正常组与模型组大鼠中也存在显著差异,说明 TAA 诱导的大鼠肝纤维化模型脂质代谢的紊乱。经过 DHI 干预治疗后,代谢物水平不同程度得到回调,表明 DHI 可通过干预多个脂质代谢通路发挥其抗肝纤维化活性。

4.6 能量代谢

三羧酸循环是糖、脂肪、氨基酸三大营养素的最终代谢通路,在能量代谢、提供生物合成的前体中起重要作用。琥珀酸既是三羧酸循环的重要中间产物,也是一种重要的细胞外信号分子,在信号传递、炎症反应、肝纤维化的发生发展中发挥着重要作用^[19]。在本研究中,肝纤维化模型组大鼠琥珀酸的代谢变化趋势均与正常大鼠相反,而给予 DHI 后趋近正常,说明 DHI 能够改善肝纤维化大鼠的能量代谢。

5 结论

本研究建立了 LC-MS 代谢组学分析的方法,通过 OPLS-DA 筛选出与肝纤维化密切相关的 38 种差异代谢产物,主要涉及谷胱甘肽代谢、褪黑素代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、三羧酸循环等途径。基于 38 种差异代谢物在正常组、模型组及 DHI 给药组之间相对含量的差异,对 DHI 预防治疗大鼠肝纤维化模型的药效进行了评价,结果表明 DHI 能够回调 34 种潜在差异代谢物的相对含量,调节部分失衡代谢通路,发挥抗肝纤维化作用。本研究为肝纤维化的新标志物和治疗靶点的发现以及 DHI 作为抗肝纤维化潜在药物的进一步开发应用提供实验依据。

【参考文献】

- [1] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs A K. Liver cirrhosis[J]. *Lancet*, 2014, 383(9930): 1749-1761.

- 8(7): 427-430.
- [14] 姜丽萍, 于桂英. 髋关节融合术后都柏林沙门菌感染1例[J]. 沈阳部队医药, 2006, 19(5): 348.
- [15] MUÑOZ-MAHAMUD E, CASANOVA L, FONT L, et al. Septic arthritis of the hip caused by nontyphi *Salmonella* after urinary tract infection[J]. *Am J Emerg Med*, 2009, 27(3): 373.e5-373373.e8.
- [16] SAMRA Y, SHAKED Y, MAIER M K. Nontyphoid salmonellosis in patients with total hip replacement: report of four cases and review of the literature[J]. *Rev Infect Dis*, 1986, 8(6): 978-983.
- [17] HUANG J L, HUNG J J, WU K C, et al. Septic arthritis in patients with systemic lupus erythematosus: *Salmonella* and non-salmonella infections compared[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2006, 36(1): 61-67.
- [18] MUSANTE D B, OGDEN W S. *Salmonella* infection in joint arthroplasty[J]. *Orthopedics*, 2004, 27(7): 770-772.
- [19] HOZACK W J, PARVIZI J. New definition for periprosthetic joint infection[J]. *J Arthroplasty*, 2011, 26(8): 1135.
- [20] 钟莹. 药物不良反应因果关系评价方法的对比: 以疏血通注射液为例[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [21] 张洁, 欧阳爱军, 王鹏. 120例患者使用β-内酰胺类抗生素交叉过敏反应相关性的研究[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(34): 36-39.
- [22] 田鑫, 乔海灵. β-内酰胺类抗生素交叉过敏反应的结构基础[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(8): 564-566.
- [收稿日期] 2021-03-06 [修回日期] 2021-05-10
[本文编辑] 陈盛新

(上接第408页)

- [2] CHANG M L, YANG S S. Metabolic signature of hepatic fibrosis: from individual pathways to systems biology[J]. *Cells*, 2019, 8(11): E1423.
- [3] GE M X, LIU H, ZHANG Y X, et al. The anti-hepatic fibrosis effects of dihydrotanshinone I are mediated by disrupting the yes-associated protein and transcriptional enhancer factor D2 complex and stimulating autophagy[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(10): 1147-1160.
- [4] WANG F, MA J, WANG K S, et al. Blockade of TNF-α-induced NF-κB signaling pathway and anti-cancer therapeutic response of dihydrotanshinone I[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 764-772.
- [5] WEI Y D, XU M J, REN Y, et al. The cardioprotection of dihydrotanshinone I against myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of arachidonic acid ω-hydroxylase[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(12): 1267-1275.
- [6] 邢心睿. 扶正化瘀方抗肝纤维化的网络多靶标作用机制研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2019.
- [7] 李俊南, 侯艳, 孙凤宇, 等. OPLS方法的原理及其在代谢组学数据判别分析中的应用[J]. *中国卫生统计*, 2014, 31(5): 765-769.
- [8] LUANGMONKONG T, SURIGUGA S, MUTSAERS H A M, et al. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis[J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2018, 175: 71-102.
- [9] HOU Y Y, WANG Y, WANG H H, et al. Induction of glutathione synthesis in human hepatocytes by acute and chronic arsenic exposure: differential roles of mitogen-activated protein kinases[J]. *Toxicology*, 2014, 325: 96-106.
- [10] TRAVERSO N, RICCIARELLI R, NITTI M, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 972913.
- [11] 高兰, 龙世棋, 陈博鑫, 等. 还原型谷胱甘肽靶向氧化应激对肝癌干细胞的作用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2020, 36(8): 887-892.
- [12] 刘仁伟, 刘冰. 黄芩苷胶囊联合胸腺法新治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(12): 3312-3316.
- [13] 岳彩飞, 洪汝涛, 徐德祥, 等. 褪黑素对PDGF诱导的肝星状细胞中JAK2/STAT3信号通路的影响[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(3): 403-407.
- [14] LIN X, KONG L N, HUANG C, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/β-catenin pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 25(2): 311-320.
- [15] LEBDA M A, SADEK K M, ABOUZED T K, et al. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes[J]. *Life Sci*, 2018, 192: 136-143.
- [16] LENG W B, LIU Y L, SHI H F, et al. Aspartate alleviates liver injury and regulates mRNA expressions of TLR4 and NOD signaling-related genes in weaned pigs after lipopolysaccharide challenge[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(6): 592-599.
- [17] 仰贤莉, 李光伟, 康璐, 等. 扶正化瘀方抗大鼠肝纤维化疗效的代谢组学研究[J]. *中成药*, 2016, 38(11): 2342-2346.
- [18] WU T, ZHENG X J, YANG M, et al. Serum lipid alterations identified in chronic hepatitis B, hepatitis B virus-associated cirrhosis and carcinoma patients[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42710.
- [19] LI Y H, WOO S H, CHOI D H, et al. Succinate causes α-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 853-858.
- [收稿日期] 2021-01-30 [修回日期] 2021-07-20
[本文编辑] 李睿旻