(8): 917-920.
[4] 王巧云, 李金莲, 刘永云, 等. 黄芪注射液对大鼠静脉血栓形成的影响[J]. 中成药, 2003, 25(6): 498-499.
[5] 高 建, 徐先祥, 徐先俊, 等. 黄芪总皂苷抗血栓形成作用实验研究[J]. 中成药, 2002, 24(2): 116-118.
[6] 樊克涛, 代向东, 闫海峰, 等. 中医药治疗血小板聚集用药规律分析[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(5): 1014-1018.
[7] Xiao C J, Zhang Y, Qiu L, *et al*. A new schistosomicidal and antioxidative phenylpropanoid from *Astragalus englerianus*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(7): 772-777.
[8] Zhao M Z, Shen Y, Xu W, *et al*. A new lignan glycoside from *Astragalus yunnanensis*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2020, 22(6): 594-600.
[9] Li J Q, Xiao C J, Li Y M, *et al*. Astrernestin, a novel aurone-phenylpropanoid adduct from the roots of *Astragalus ernestii*[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(20): 2894-2899.
[10] 沈 磊, 崔淑君, 王 敏, 等. 3 种黄芪属植物提取物对血小板聚集的影响[J]. 大理大学学报, 2019, 4(10): 22-26.
[11] 周尹轶凡, 李益萍, 高俊杰, 等. 活血化瘀类中药抗血小板作用机制研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(3): 659-662.
[12] 郭朝锋, 穆玉明. 三氯化铁动物血栓模型方法学及其应用研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗学杂志, 2010, 24(6): 537-539.
[13] Estevez B, Du X P. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling[J]. *Physiology* (*Bethesda*), 2017, 32(2): 162-177.
[14] McFadyen J D, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(3): 181-191.
[15] Crescente M, Armstrong P C, Kirkby N S, *et al*. Profiling the eicosanoid networks that underlie the anti-and pro-thrombotic effects of aspirin[J]. *FASEB J*, 2020, 34(8): 10027-10040.

参苓白术散与肾气丸干预脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的代谢组学研究

王婧婧, 古诗琴, 蔡 莹, 孙相如, 杨艳红, 胡方林*
(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

摘要: 目的 基于结肠组织代谢组学探究参苓白术散与肾气丸“朝夕互补”(朝夕互补方) 对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的作用机制。**方法** 采用病证结合法制备脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型, 通过观察大鼠结肠组织病理学变化、疾病活动指数 (DAI) 评分、结肠组织病理学评分等初步评价朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的干预作用。利用液相色谱-四级杆/飞行时间质谱联用技术 (LC-QTOF-MS) 对各组大鼠结肠组织进行代谢组学分析, 通过主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 结合 *t* 检验和变量投影重要性 (VIP) 筛选证候相关的生物标志物, 利用 KEGG 数据库对筛选的差异代谢物进行注释和通路富集。**结果** 朝夕互补方可明显改善脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的宏观体征和结肠炎症病变。代谢组学初步筛选出 26 个可能与脾肾阳虚型溃疡性结肠炎相关的代谢生物标志物, 朝夕互补方对相关的 17 个代谢物有明显的改善作用, 主要涉及嘌呤代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、半乳糖代谢等代谢通路。**结论** 参苓白术散与肾气丸“朝夕互补”对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠有一定的干预作用, 其机制可能与调节氨基酸代谢、氧化应激反应及能量代谢等有关。

关键词: 参苓白术散; 肾气丸; 朝夕互补方; 溃疡性结肠炎; 脾肾阳虚; 代谢组学; 液相色谱-四级杆/飞行时间质谱 (LC-QTOF-MS)
中图分类号: R285.5 **文献标志码**: B **文章编号**: 1001-1528(2022)11-3690-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.053

收稿日期: 2022-02-24
基金项目: 湖南省教育厅双一流重点课题项目 (18A213)
作者简介: 王婧婧 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中医各家学说及消化系统疾病的发病机制与诊治规律。E-mail: 834173077@qq.com
*通信作者: 胡方林 (1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医各家学说及消化系统疾病的发病机制与诊治规律。E-mail: 970679945@qq.com

溃疡性结肠炎是一种主要累及直肠、结肠黏膜和黏膜下层的慢性非特异性炎症，属于炎症性肠病范畴，临床主要表现为腹泻、腹痛、黏液脓血便及里急后重等[1]。中医基于“病证结合”与“辨证论治”的诊疗体系及治疗方式，在促进溃疡愈合、减轻患者症状、增强体质等方面取得了显著的疗效。

溃疡性结肠炎可归属于中医学中“休息痢”“大瘕泻”“大肠胀”等范畴，邪客于大肠，与气血搏结，血络损伤，肉腐成脓，如迁延不愈，进展至疾病后期，多会出现脾肾阳虚的表现[2]。明代医家薛己首创朝夕互补法治疗虚损病，朝用补中益气汤，夕用肾气丸治疗脾肾亏损证[3]。脾肾阳虚型溃疡性结肠炎久泄伤阴，阴损及阳，临床朝用参苓白术散培补脾土，健脾止泻，滋其化源；夕用肾气丸温补肾阳，补火生土，脾肾并重治疗脾肾阳虚型溃疡性结肠炎疗效显著[4]，但其作用机制尚不明确。

代谢组学因其具有高通量、高灵敏度、高精确性的优势，能定性或定量动态检测机体小分子代谢产物的变化，具有整体性和动态性[5-6]。因此，本研究采用基于 LC-QTOF-MS 的代谢组学方法，对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织代谢物进行分析鉴定，筛选差异代谢物，从内源性代谢角度探讨参苓白术散与肾气丸“朝夕互补”干预脾肾阳虚型溃疡性结肠炎的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只，体质量（200±20）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（湘）2019-0009。大鼠分笼饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房，温度 22~26 ℃，相对湿度 40%~65%。本研究方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准（编号 LL2020090901）。

1.2 药物 参苓白术散（人参 15 g、白术 15 g、白茯苓 15 g、炒甘草 10 g、薏苡仁 9 g、莲子肉 9 g、缩砂仁 6 g、白扁豆 12 g、炒桔梗 6 g、山药 15 g、大枣 3 枚）、肾气丸（干地黄 24 g、山药 12 g、山茱萸 12 g、泽泻 9 g、茯苓 9 g、牡丹皮 9 g、炮附子 3 g、桂枝 3 g），药材饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房，经湖南中医药大学胡方林教授鉴定为正品。按原方比例称取药材[7]，常规煎法煎煮 2 次，第 1 次加 8 倍量水浸泡 30 min，煎煮1 h，取煎液，第 2 次加 5 倍量水，煎煮 30 min，取煎液，2 次煎液混合后浓缩，参苓白术散汤剂和肾气丸汤剂分别浓缩至生药量 1 g/mL。大黄中药材煎煮方法同前，浓缩至生药量 1.35 g/mL，4 ℃冰箱保存备用[8]。美沙拉嗪肠溶片研磨成粉剂备用。

1.3 试剂 三硝基苯磺酸（TNBS，批号 SLCG2384），购自美国 Sigma 公司；氢化可的松注射液（批号 2008201），购自国药集团容生制药有限公司；便隐血（OB）试剂（批号 B200901），购自珠海贝索生物技术有限公司；美沙拉嗪肠溶片（批号 20200604），购自黑龙江天宏药业股份有限公司。乙腈、甲酸均为色谱纯，购自德国默克公司。

1.4 仪器 液相色谱-四级杆/飞行时间质谱联用仪（型号 Triple TOFTM5600，美国 AB SCIEX 公司）；脱水机、包埋机（型号 JJ-12J、JB-P5，武汉俊杰电子有限公司）；病理切片机（型号 RM2016，上海徕卡仪器有限公司）；正置光学显微镜、成像系统（型号 Nikon Eclipse E100、Nikon DS-U3，日本尼康公司）。

2 方法

2.1 造模 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立采用病证结合法，参考文献［8］报道，第一阶段复制“脾虚”模型，正常组大鼠灌胃给予蒸馏水，每只 2 mL，模型组大鼠上午灌胃给予大黄水煎液，每只 2 mL，连续14 d；第二阶段复制“脾肾阳虚”模型，第 15 天在模型组大鼠左右肢臀部交替处肌肉注射氢化可的松 25 mg/kg，连续 10 d，第 25 天禁食不禁水，第 26 天用 100 mg/kg TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合试剂灌肠，正常组用等体积蒸馏水灌肠，进而建立脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型。

2.2 模型评判标准 造模后第 3 天，从正常组和模型组分别随机选取 2 只大鼠处死，镜下观察结肠组织结构、炎症及溃疡损伤等情况。参照《中医虚证辨证参考标准》的“证候诊断”标准[9]进行评价，①大便溏泄，甚则脱肛；②消瘦，食欲下降，体质量减轻；③畏寒，弓背，蜷缩聚堆；④神态萎靡，毛色枯槁无光泽；⑤易疲劳乏力，嗜卧，第①~③项为脾肾阳虚证主症，第④⑤项为脾肾阳虚证兼症。具备 2 项主症及 2 项兼症即可认为脾肾阳虚证模型复制成功。在宏观体征表现的基础上，结合镜下结肠黏膜病理变化判断模型制备成功与否。

2.3 分组与给药 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎成模大鼠按随机数字表法分为模型组、朝夕互补方组、美沙拉嗪组，每组 7 只。从造模后第 7 天开始给药，药物剂量按成人临床等效剂量换算为大鼠给药剂量[10]，朝夕互补方组上午灌胃给予 5.04 g/kg 参苓白术散汤剂，下午灌胃给予 3.645 g/kg 肾气丸汤剂；美沙拉嗪组灌胃给予 0.18 g/kg 美沙拉嗪混悬液；正常组和模型组灌胃给予 1 mL/kg 0.9% 生理盐水，每天上午 9 时~10 时灌胃，下午 5 时~6 时灌胃，连续 21 d。

2.4 大鼠一般情况观察 观察大鼠的精神状态、毛发色泽、饮食量、大便性状、死亡等情况。

2.5 大鼠疾病活动指数（DAI）评分 从给药第 1 天起，每 3 d 记录大鼠体质量变化、粪便性状和隐血，采用匹拉米洞半定量检测法检测大鼠粪便隐血。参考 Hamamoto[11] 标准进行 DAI 评分，见表 1，评估造模后溃疡性结肠炎的活动程度。DAI 评分=（体质量下降计分+大便性状计分+大便隐血情况计分）/3。

表 1 DAI 评分标准

记分/分	体质量下降	大便性状	大便隐血
0	<1%	正常(成型,颗粒状)	正常
1	1%~5%		隐血(+)
2	6%~10%	松散(糊状,不粘附肛门)	隐血(++)
3	11%~15%		隐血(+++)
4	>15%	腹泻(水样,粘附肛门)	隐血(++++)

2.6 结肠组织病理形态评价 取出固定于 4% 多聚甲醛溶液中的病变结肠组织，石蜡包埋后制作病理切片，再进行 HE 染色。镜下观察结肠组织结构、炎症及溃疡损伤等情况。参照 Morris[12] 标准评分，见表 2，求和并取平均值。

表 2 病理组织学评分标准

分值/分	炎症程度	炎症浸润情况	隐窝损失情况
0	无	无	无
1	轻度	固有层	基底 1/3 受损
2	中度	黏膜和黏膜下层	基底 2/3 受损，表面上皮完整
3	重度	透壁	整个隐窝和上皮丢失

2.7 结肠组织代谢组学检测

2.7.1 色谱条件 Waters Acquity HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相 0.1% 甲酸溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~13 min，1% B；13~16.5 min，99% B；16.5~20 min，1% B）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 3 μL。

2.7.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源（ESI），正负离子模式检测；正离子喷雾电压（ISVF）5 500 V，负离子 ISVF −4 500 V；雾化气温（TEM）550 ℃；雾化气（GS1）和辅助气（GS2）均为 55 psi；气帘气（CUR）35 psi；正离子碰撞能量（CE）10 V，负离子 CE−10 V；正离子去簇电压（DP）80 V，负离子 DP −80 V；扫描范围 60~1 000 *m/z*。

2.7.3 数据处理及多元统计分析 使用 Proteo Wizard 软件将质谱原始数据转成 mzXML 格式，使用 XCMS 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等。利用 R 语言中的 StatTarget 包对信号进行校正，各组积分峰面积值为代谢物的含量，以（$\bar{x}\pm s$）表示。将数据导入 Metabo Analyst4.0（www.metaboanalyst.ca）软件进行归一化处理后，应用主成分分析（principal component analysis，PCA）和偏最小二乘判别分析（partial least square discriminant analysis，PLS-DA）分别显示不同组别在计分图上的分布。PCA 在最大程度提取原始信息的同时对数据进行降维处理，通过主成分来描述机体代谢的情况；PLS-DA 则可使组间差异最大化。为了寻找潜在的生物标志物，通过组与组之间两两对比，从正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）负荷图中筛选 VIP>1.5（VIP 表示投影中可变重要性）的离子，并对这些离子进行 *t* 检验、变异倍数分析 FC（fold change analysis）的单变量统计检验。$P<0.05$ 并且 FC>1.5（或<0.67）的离子最终被认为是潜在的内源性差异代谢物。利用鉴定出的差异代谢物 KEGG ID 进行代谢通路分析。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，单变量的计量资料样本均数间比较，若符合正态分布，用单因素方差分析，多重比较用 LSD 分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠一般情况的影响 与正常组大鼠比较，模型组大鼠出现蜷卧少动，行动迟缓，喜扎堆，弓背，腹胀，毛发乱无光泽，耳及四肢爪甲色淡白，舌质紫暗，尿液清，大便稀溏色黑，肛周污染，生物学表征符合脾肾阳虚型溃疡性结肠炎的临床证候特点；美沙拉嗪组大鼠大便由稀溏转为松散，颜色由黑转为黄褐色，腹胀减轻，毛发逐渐光泽，行动稍迟缓，喜扎推，无弓背，耳及四肢爪甲色淡红；朝夕互补方组大鼠大便形状逐步恢复正常，由稀溏转为松散至颗粒状，颜色由黑转为黄褐色，尿液色淡黄，无腹胀，毛发逐渐光泽，行动逐步灵活，耳及四肢爪甲色逐渐红润。

3.2 朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 DAI 评分的影响 模型组大鼠 DAI 评分随时间延长呈上升趋势，且高于正常组；从治疗第 3 天开始，美沙拉嗪组和朝夕互补方组大鼠 DAI 评分呈下降趋势，朝夕互补方组大鼠 DAI 评分趋于正常组，且优于美沙拉嗪组，见图 1。

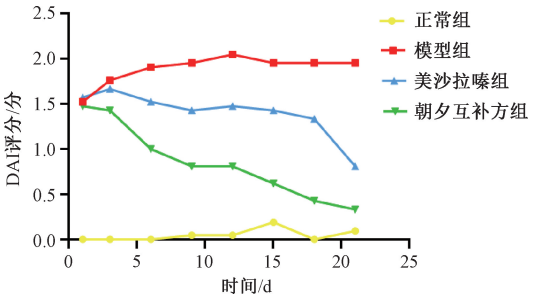


图 1 各组大鼠 DAI 评分（*n*=7）

3.3 朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理变化的影响 正常组大鼠结肠组织表面光滑良好，黏膜各层结构完整，无炎性细胞浸润，黏膜无充血水肿及溃疡形成；模型组大鼠结肠黏膜充血水肿、溃疡形成，黏膜组织可见大量炎性细胞（如中性粒细胞）浸润，病理评分高于正常组（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠结肠黏膜结构有不同程度的改善，炎性细胞浸润减少，组织病理评分均低于模型组（$P<0.01$），其中朝夕互补方作用优于美沙拉嗪，见图 2、表 3。

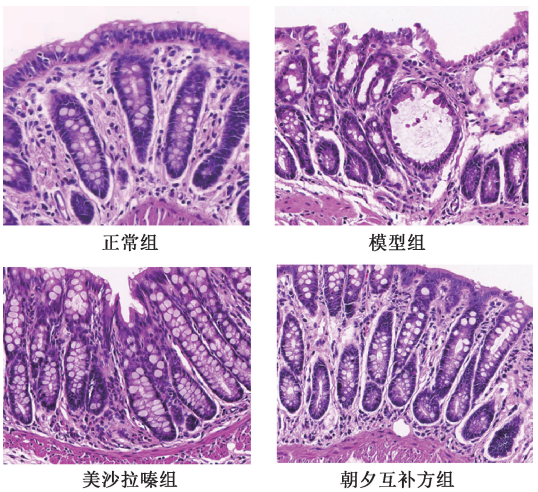


图 2 各组大鼠结肠组织病理图（HE，×200）

表 3 各组大鼠结肠组织病理评分比较（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

组别	病理评分/分
正常组	0
模型组	2.62±0.13**
美沙拉嗪组	1.76±0.76##
朝夕互补方组	1.33±0.27##

注：与正常组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，## $P<0.01$。

3.4 朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织代谢组学的影响

3.4.1 结肠组织 PCA、PLS-DA 分析 点代表样本，所有样本点均分布在 95% 置信区间。图 3A 为 PCA 分析结果，正常组与模型组完全分离，其代谢轮廓相异；朝夕互补方组、美沙拉嗪组在正常组与模型组之间。图 3B 为 PLS-DA 分析结果，正常组、模型组、朝夕互补方组、美沙拉嗪组样本分离，说明其代谢轮廓相异。提示，朝夕互补方干预后，脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠结肠组织代谢轮廓向正常组靠近，表明内源性代谢紊乱有所改善。

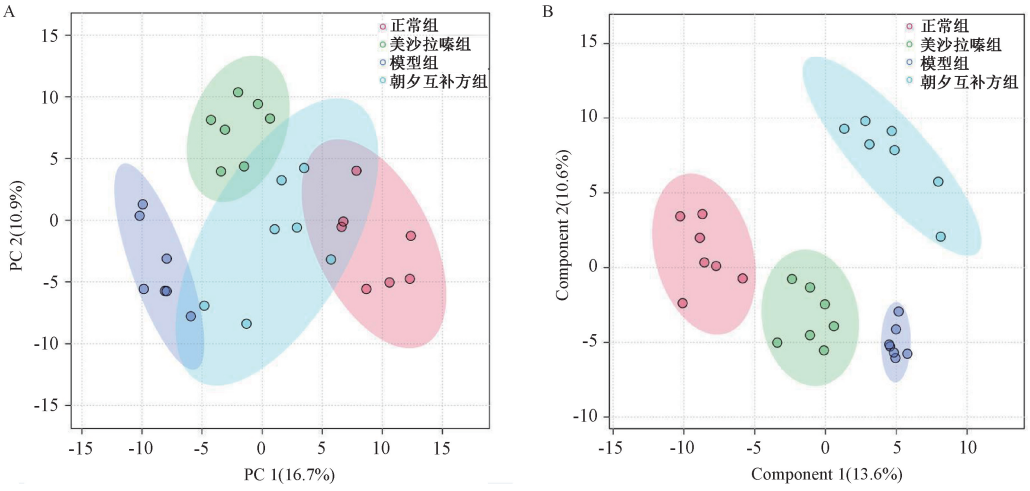
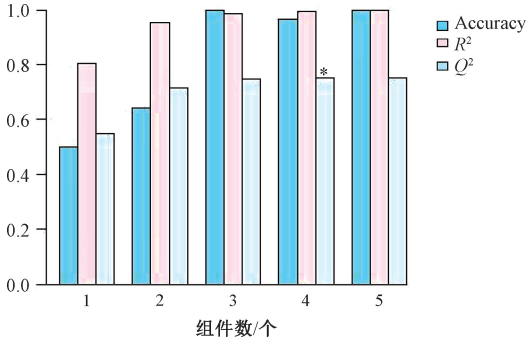


图 3 各组大鼠结肠组织 PCA（A）、PLS-DA（B）得分图

3.4.2 PLS-DA 交叉验证 交叉验证用于评价模型的质量，R^2 为模型建立的准确率，R^2 越高，表示模型的质量高。Q^2 为模型的预测准确率，Q^2 越高，表示模型的预测能力越高。由图 4 可得，大鼠结肠组织样本 $R^2=0.996$，$Q^2=0.749$，说明模型的质量与预测准确率均较好，不存在“过拟合”现象。



注：交叉验证确定建立偏最小二乘模型所需的最佳组件数量，默认衡量标准为 Q^2，* 表示 4 组件模型是最好的。

图 4 大鼠结肠组织 PLS-DA 交叉验证图

3.4.3 差异代谢物的筛选 以 VIP>1.5、$P<0.05$、FC>1.5（或<0.67）为筛选条件，最终得到 26 个模型组与正常组间差异代谢物，对这些差异代物的定量信息进行热图分析，见图 5。颜色深浅表示不同的强度，从红色到蓝色，表示强度从高到低。结果显示，不同组别的个体均能很好地聚集在各自的组别中，说明这 26 个差异代谢物能够将 4 组完全区分。

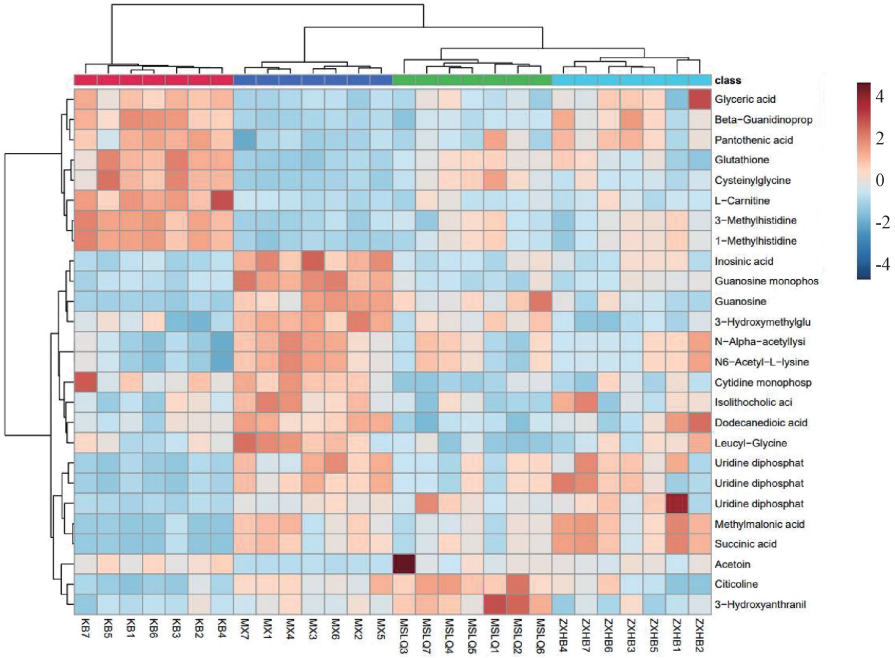
3.4.4 最终差异代谢物筛选及代谢通路分析 首先筛选出正常组与模型组之间的差异代谢物，在此基础上观察美沙拉嗪和朝夕互补方对这些代谢物的影响。朝夕互补方对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎相关的 17 个代谢物有改善作用（$P<0.05$，$P<0.01$），代谢物信息详见表 4。将 17 个差异代谢标志物进行 MetPA 分析，得到 14 条代谢通路（$P<0.05$），其中嘌呤代谢（0.200）、氨基糖和核苷酸糖代谢（0.121）2 条代谢通路的影响值大于 0.1，可作为主要代谢通路，见图 6。

4 讨论

本实验采用基于 LC-QTOF-MS 的代谢组学方法探讨参苓白术散与肾气丸“朝夕互补”对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的作用机制。朝夕互补方可使紊乱的代谢谱向正常的趋势回归，筛选出 17 个与脾肾阳虚型溃疡性结肠炎相关的差异代谢物，涉及 14 条代谢通路，可部分揭示朝夕互补方的作用机制。

4.1 氨基酸代谢 色氨酸是一种在免疫调节过程中起关键作用的氨基酸，在巨噬细胞内通过犬尿氨酸途径生成 3-羟基邻氨基苯甲酸[13]。模型组大鼠 3-羟基邻氨基苯甲酸含量升高，显示机体色氨酸代谢紊乱；经朝夕互补方干预后下调，提示其可能通过纠正色氨酸代谢紊乱以减轻溃疡性结肠炎大鼠炎症反应。*N*6-乙酰-*L*-赖氨酸是赖氨酸降解的中间产物，*N*-α-乙酰赖氨酸是赖氨酸与乙酰辅酶 A 进行乙酰化的中间代谢物[14]。赖氨酸作为一种

必须氨基酸，具有促进机体发育，提高免疫功能的作用。赖氨酸乙酰化调节巨噬细胞中代谢酶的活性、稳定性以及控制炎症因子的产生从而调节炎症反应[15]。模型组 *N*6-乙酰-*L*-赖氨酸、*N*-α-乙酰赖氨酸含量升高；经朝夕互补方干预后下调，提示其可能通过调节赖氨酸代谢发挥抗炎作用。



注：KB1～KB7 为正常组，MX1～MX7 为模型组，MSLQ1～MSLQ7 为美沙拉嗪组，ZXHB1～ZXHB7 为朝夕互补方组。

图 5　各组大鼠结肠组织差异代谢物热图

表 4　各组大鼠结肠组织差异代谢物比较（$\bar{x}\pm s$，$n=7$）

编号	代谢物	正常组	模型组	美沙拉嗪组	朝夕互补方组
1	肌苷酸	149. 63±78. 38 **	1 495. 31±375. 51	400. 68±203. 43 **	460. 33±271. 99 **
2	甲基丙二酸	144. 67±90. 94 **	1 323. 87±433. 23	740. 99±209. 40 **	1 354. 26±548. 60
3	丁二酸	145. 66±91. 52 **	1 331. 94±373. 04	821. 41±291. 62 **	1 372. 16±557. 22
4	磷酸鸟苷	256. 14±99. 53 **	1 695. 25±264. 80	459. 08±240. 16 **	500. 80±172. 43 **
5	尿苷二磷酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖	189. 24±73. 75 **	1 173. 15±218. 73	1 194. 13±679. 30	1 461. 75±1 479. 26
6	鸟苷	308. 95±71. 49 **	1 769. 21±433. 97	1 292. 28±453. 37 **	647. 79±164. 56 **
7	尿苷二磷酸葡萄糖	234. 56±55. 72 **	1 179. 90±364. 73	672. 37±218. 35 **	851. 70±392. 32 *
8	尿苷二磷酸半乳糖	234. 53±55. 70 **	1 164. 72±189. 29	679. 99±218. 62 **	823. 29±407. 43 *
9	胞磷胆碱	352. 31±165. 80 **	1 365. 13±296. 86	1 657. 17±395. 13	678. 41±315. 71 **
10	*N*-α-乙酰赖氨酸	430. 63±182. 45 **	1 514. 65±273. 27	959. 42±295. 28 **	886. 99±281. 56 **
11	*N*6-乙酰-*L*-赖氨酸	435. 13±187. 49 **	1 525. 74±275. 05	965. 94±296. 98 **	892. 30±283. 47 **
12	3-羟甲基戊二酸	1 325. 00±679. 07 **	4 144. 54±510. 75	2 588. 23±313. 66 **	1 440. 80±396. 72 **
13	异石胆酸	301. 46±87. 01 **	853. 87±210. 67	409. 28±173. 85 **	532. 97±249. 64 *
14	十二烷二酸	506. 56±93. 65 **	1 189. 66±157. 62	573. 64±133. 53 **	783. 59±338. 88 *
15	3-羟基邻氨基苯甲酸	539. 65±195. 23 **	1203. 94±190. 06	1 827. 39±496. 13 **	699. 84±256. 49 **
16	亮氨酸甘氨酸	686. 08±171. 31 **	1 529. 40±300. 32	821. 34±224. 87 **	921. 32±210. 48 **
17	单磷酸胞苷	991. 69±159. 04 **	1 724. 50±166. 34	1 089. 98±156. 51 **	1 036. 26±218. 71 **
18	β-胍基丙酸	1 346. 77±124. 33 **	955. 88±95. 71	1 010. 73±154. 96	1 357. 31±336. 58 **
19	甘油酸	1 295. 91±122. 84 *	875. 40±151. 33	1 057. 35±356. 27	1 367. 54±645. 86 *
20	3-甲基组氨酸	1 298. 72±233. 81 **	869. 03±136. 27	1 094. 50±300. 55	1 000. 57±369. 14
21	左旋肉碱	1 586. 15±329. 05 **	1 051. 63±117. 88	1 104. 78±251. 04	947. 62±186. 67
22	1-甲基组氨酸	1 296. 37±233. 89 **	766. 09±92. 49	1 092. 40±202. 63 *	1 002. 91±370. 10
23	泛酸	1 391. 51±225. 32 **	806. 46±340. 22	1 201. 61±467. 37 *	1 430. 27±339. 33 **
24	乙偶姻	1 500. 37±531. 14 *	694. 53±53. 27	2 992. 63±3 887. 96 *	1 356. 69±269. 03
25	谷胱甘肽	1 853. 77±601. 47 **	815. 19±186. 67	1 690. 15±195. 59 **	1 180. 95±520. 98
26	半胱氨酸甘氨酸	1 903. 52±748. 01 **	742. 51±145. 62	1 854. 61±447. 16 **	1 089. 31±301. 26

注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

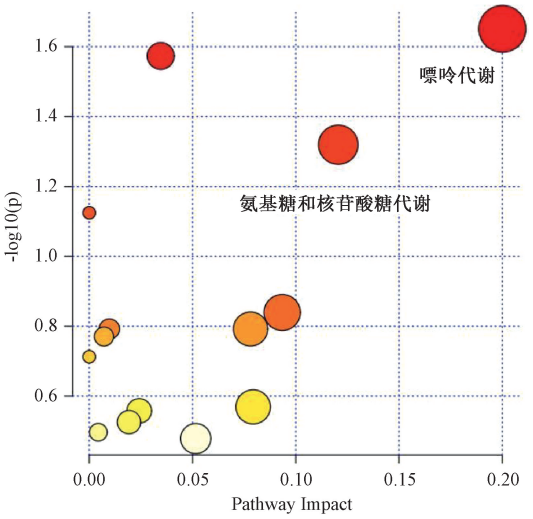


图 6 差异代谢物 MetPA 通路分析

4.2 *嘌呤代谢* 鸟苷是一种以鸟嘌呤为基础的细胞外信号分子，可提高髓过氧化物酶活性以发挥抗炎和抗氧化作用[16]。肌苷酸是磷酸鸟苷的胞内前体，通过代谢肌苷发挥作用[17]。研究表明，肌苷对 TNBS 诱导的大鼠结肠炎可通过促进尿酸生成发挥抗炎作用[18]。模型组鸟苷、肌苷酸和磷酸鸟苷含量升高；经朝夕互补方干预后下调，提示其可能通过干预嘌呤代谢促进尿酸生成发挥抗炎、抗氧化作用。

4.3 *脂类代谢* 胞磷胆碱是内源性合成磷脂酰胆碱的中间体，参与细胞膜的形成和修复[19]。3-羟甲基戊二酸是胆固醇代谢的中间产物[20]。胆固醇参与维持细胞膜的通透性和流动性以及跨膜信号通路的调节[21]。模型组胞磷胆碱、3-羟甲基戊二酸含量升高，可能由于溃疡性结肠炎结肠组织抗氧化能力下降，细胞释放活性氧与活性氮破坏细胞膜的稳定性[18]；经朝夕互补方干预后下调，提示其可能通过干预胆固醇代谢，修复细胞膜，维持细胞膜的稳定性以改善结肠黏膜损伤。甘油酸是甘油氧化产物，能促进内源性前列腺素的合成，增加黏膜血流量，增强胃肠平滑肌收缩[22]。模型组甘油酸含量降低；经朝夕互补方干预后上调，提示其可能通过促进甘油氧化，增加黏膜血流量以促进溃疡愈合，增强胃肠平滑肌收缩，促进胃肠蠕动以减轻大鼠腹胀。

4.4 *能量代谢* 尿苷二磷酸葡萄糖和尿苷二磷酸半乳糖是基于尿苷二磷酸的 2 个己糖变体，可分解代谢 ATP 为机体提供能量[23]。十二烷二酸是一种含 12 个碳原子的饱和脂肪族二元酸，能为 ATP 合成提供中间底物，且能量密度较高，可作为肠外营养的替代燃料底物之一[24-26]。上述代谢物在模型组中含量升高，与溃疡性结肠炎炎症部位新陈代谢增加需要消耗大量能量相符；经朝夕互补方干预后恢复至正常水平，提示其可能通过纠正能量代谢紊乱以改善结肠组织炎症反应。

4.5 *维生素代谢及其他* 泛酸（维生素 B5）具有促进代谢和抗氧化的作用，参与辅酶 A 合成，高度依赖辅酶 A 的结肠组织在泛酸缺乏时易造成细胞损伤[27]。β-胍基丙酸是肌酸类似物，能够提高机体内线粒体酶活性，改善线粒体功能，提高抗氧化能力[28]。本研究发现，经朝夕互补方干预后，可上调泛酸和 β-胍基丙酸，提示其可能通过干预维生素代谢，促进辅酶 A 合成，增强抗氧化能力以减轻炎症。

综上所述，参苓白术散与肾气丸“朝夕互补”可改善脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠的宏观体征，减轻结肠炎症，促进溃疡愈合，联合结肠组织代谢组学发现其差异代谢物主要参与氨基酸代谢、氧化应激反应及能量代谢等。

参考文献：

[1] Moon W. Golimumab therapy in ulcerative colitis[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2016, 67(2): 64-73.
[2] 周 瑾, 朱 莹. 朱莹治疗溃疡性结肠炎脾肾阳虚证经验[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(5): 31-32.
[3] 薛 己. 内科摘要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019.
[4] 王 跃, 尹国平, 朱瑞华. “朝夕互补法”治疗溃疡性结肠炎 83 例临床观察[J]. 浙江中医杂志, 2007, 42(10): 589.
[5] Barton R H. A decade of advances in metabonomics[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(2): 129-136.
[6] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: Metabonomics[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056.
[7] 李 冀. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
[8] 吴玉泓, 许雅清, 李海龙, 等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 116-119.
[9] 刘金响, 史 英, 刘海涛, 等. 大鼠溃疡性结肠炎中医证候动物模型研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(2): 93-96.
[10] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
[11] Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, *et al*. Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS) -induced colitis in mice by intracolonically administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)) [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 117(3): 462-468.
[12] Morris G P, Beck P L, Herridge M S, *et al*. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
[13] Oh G S, Pae H O, Choi B M, *et al*. 3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan *via* indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression. [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(4): 1156-1162.
[14] Schmidt H, Bode R. Characterization of a novel enzyme, *N*6-acetyl-*L*-lysine: 2-oxoglutarate aminotransferase, which catalyses the second step of lysine catabolism in Candida maltosa[J].

Antonie Van Leeuwenhoek, 1992, 62(4): 285-290.

[15] Shakespear M R, Iyer A, Cheng C Y, *et al*. Lysine deacetylases and regulated glycolysis in macrophages[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(6): 473-488.

[16] Zizzo M G, Caldara G, Bellanca A, *et al*. Preventive effects of guanosine on intestinal inflammation in 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis in rats[J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2): 349-359.

[17] Lovászi M, Németh Z H, Gause W C, *et al*. Inosine monophosphate and inosine differentially regulate endotoxemia and bacterial sepsis[J]. *FASEB J*, 2021, 35(11): e21935.

[18] Rahimian R, Fakhfouri G, Daneshmand A, *et al*. Adenosine A_{2A} receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1-3): 376-381.

[19] Weiss G B. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline[J]. *Life Sci*, 1995, 56(9): 637-660.

[20] Gärtner S, Carvalho J J, Emmerling F, *et al*. Polyclonal murine and rabbit antibodies for the bile acid isolithocholic acid[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2015, 36(3): 233-252.

[21] Afonso M S, Machado R M, Lavrador M S, *et al*. Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis[J]. *Nutrients*, 2018, 10(6): 760.

[22] Chang X, Wang S, Bao Y R, *et al*. Multicomponent, multitarget integrated adjustment-metabolomics study of Qizhiweitong particles curing gastrointestinal motility disorders in mice induced by atropine[J]. *J Ethnopharmacology*, 2016, 189: 14-21.

[23] Ren J, Malloy C R, Sherry A D. ^{31}P-MRS of the healthy human brain at 7 T detects multiple hexose derivatives of uridine diphosphate glucose[J]. *NMR Biomed*, 2021, 34(7): e4511.

[24] Bertuzzi A, Mingrone G, De Gaetano A, *et al*. Kinetics of dodecanedioic acid and effect of its administration on glucose kinetics in rats[J]. *Br J Nutr*, 1997, 78(1): 143-153.

[25] Salinari S, Bertuzzi A, Gandolfi A, *et al*. Dodecanedioic acid overcomes metabolic inflexibility in type 2 diabetic subjects[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(5): E1051-E1058.

[26] Mingrone G, Castagneto M. Medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids as novel energy substrates: an update[J]. *Nutr Rev*, 2006, 64(10 Pt 1): 449-456.

[27] Roediger W E W. Causation of human ulcerative colitis: A lead from an animal model that mirrors human disease[J]. *JGH Open*, 2019, 3(4): 277-280.

[28] 杨 思. β-胍基丙酸对果蝇寿命的影响及其机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.

基于网络药理学探讨祛瘀散结胶囊治疗子宫肌瘤的作用机制

龙立活[1], 陆永梅[1], 何 佳[2], 高红伟[2], 奉建芳[2], 唐红珍[2]
(1. 广西药用植物园, 广西 南宁 530012; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200)

摘要: 目的 基于网络药理学探讨祛瘀散结胶囊对治疗子宫肌瘤的作用机制。**方法** 通过 ETCM、TCMSP 等数据库收集祛瘀散结胶囊活性成分及相关作用靶点, GeneCards 数据库收集子宫肌瘤相关靶点, Venny 平台收集成分-疾病共同靶点, STRING 数据库构建交互靶点蛋白互作网络信息并进行基因功能富集分析, AutoDock Vina 进行分子对接分析, 采用组织病理学与酶联免疫吸附法(ELISA)进行体内实验验证。**结果** 祛瘀散结胶囊筛选得到 132 种活性成分, 与子宫肌瘤共同作用靶点有 52 个, 富集得到 137 条 KEGG 信号通路, 主要涉及癌症通路、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、液体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、内分泌抵抗信号通路、HIF-1 信号通路等; 祛瘀散结胶囊中主要潜在活性化合物槲皮素与关键靶点 TP53、TNF、CASP3、ESR1、MMP9、PTGS2 结合性良好。祛瘀散结胶囊能下调子宫肌瘤模型大鼠血清与组织中雌二醇(E_2)、孕酮(P)、雌激素受体(ER)等水平, 改善其组织病理状态。**结论** 祛瘀散结胶囊可通过多通路、多靶点治疗子宫肌瘤。

关键词: 祛瘀散结胶囊; 子宫肌瘤; 网络药理学; 雌二醇(E_2); 孕酮(P); 雌激素受体(ER)
中图分类号: R966 **文献标志码**: B **文章编号**: 1001-1528(2022)11-3696-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.054

收稿日期: 2022-01-04
基金项目: 广西中医药大学科技服务项目(H2019017)
作者简介: 龙立活(1964—), 男, 主管药师, 研究方向为保健品研发。Tel: 13978887487, E-mail: 923557887@qq.com
*通信作者: 唐红珍(1968—), 女, 教授, 研究方向为中医、中药肥胖研究。Tel: 18577181133, E-mail: 383744825@qq.com