

# 乌药水提物干预腹泻型肠易激综合征大鼠的血清代谢组学研究

刘涛<sup>1,2</sup>, 伍梦玲<sup>1</sup>, 邓国艳<sup>1</sup>, 何阳<sup>1</sup>, 何怡然<sup>1</sup>, 邓桂明<sup>1\*</sup>, 欧阳林旗<sup>1,3\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 中南大学湘雅医学院附属长沙医院, 湖南长沙 410005; 3. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

**[摘要]** 基于血清代谢组学探讨乌药水提物(Linderae Radix water extract, LRWE)防治腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)的作用机制。选取2周龄雄性SD大鼠18只,随机分为对照组(control)、IBS-D组、LRWE干预组。除对照组外,其余大鼠接受“番泻叶灌胃联合束缚应激”刺激,构建IBS-D大鼠模型。LRWE干预组大鼠灌胃LRWE(5.4 g·kg<sup>-1</sup>),control组、IBS-D组灌胃等体积蒸馏水,共计14 d;采用结肠扩张实验结合腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分评价大鼠内脏敏感性;检测大鼠粪便含水率(fecal water content, FWC)评价大鼠腹泻程度;采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、过碘酸席夫(periodic acid-schiff, PAS)染色分别观察结肠组织形态学变化、杯状细胞形态及数量;应用超高效液相色谱串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)进行大鼠血清代谢组学分析,筛选潜在生物标志物及其相关代谢通路。结果显示,LRWE可降低IBS-D大鼠AWR评分,改善内脏敏感性;降低IBS-D大鼠FWC,改善腹泻症状。HE染色和PAS染色显示,LRWE能改善IBS-D大鼠肠道轻度炎症,增加结肠上皮中成熟分泌态杯状细胞数量。血清代谢组学分析共筛选出25种LRWE干预IBS-D大鼠的潜在生物标志物,涉及代谢通路包括核黄素、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等,其中核黄素及色氨酸代谢通路调控作用最明显。LRWE改善IBS-D大鼠内脏高敏性、腹泻等症状,其作用机制可能与促进IBS-D大鼠能量代谢及氨基酸代谢,增强肠道屏障功能,改善肠道免疫功能有关。

**[关键词]** 乌药水提物; 腹泻型肠易激综合征; 代谢组学; 潜在生物标志物; 核黄素代谢; 色氨酸代谢

## Linderae Radix water extract treats diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats: a serum metabolomics study

LIU Tao<sup>1,2</sup>, WU Meng-ling<sup>1</sup>, DENG Guo-yan<sup>1</sup>, HE Yang<sup>1</sup>, HE Yi-ran<sup>1</sup>, DENG Gui-ming<sup>1\*</sup>, OUYANG Lin-qi<sup>1,3\*</sup>

(1. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Changsha Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410005, China;

3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** This study aims to investigate the mechanism of Linderae Radix water extract (LRWE) in the prevention and treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) based on serum metabolomics. Eighteen 2-week-old male SD rats were randomized into control, IBS-D model, and LRWE groups. The rats in other groups except the control group received gavage of senna concentrate combined with restraint stress for the modeling of IBS-D. The rats in the LRWE group were administrated with LRWE (5.4 g·

**[收稿日期]** 2023-04-14

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5434, 2022JJ70028); 湖南省中医药科研计划项目(201986, 2021016); 湖南中医药大学校级科研基金项目(2022YYZK002, 2019XJJ025); 湖南省“十四五”中医重点专科-中药学项目(湘中医药函[2023]4号); 湖南省教育厅科学研究重点项目(19A372)

**[通信作者]** \* 邓桂明, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药效机制及特色中药制剂研究, E-mail: dengguiming@hnu.cm.edu.cn; \* 欧阳林旗, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床中医学、中药药理学研究, E-mail: oylqzyfy03@hnu.cm.edu.cn

**[作者简介]** 刘涛, 硕士, 中药师, 主要从事中药药理学研究, E-mail: 532802017@qq.com

kg<sup>-1</sup>) by gavage, and those in the control and IBS-D model groups with an equal volume of distilled water for a total of 14 days. The visceral sensitivity was evaluated by the abdominal withdrawal reflex (AWR) score, and the degree of diarrhea was assessed by the fecal water content (FWC). The morphological changes of the colon and the morphology and number of goblet cells were observed by hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-schiff (PAS) staining, respectively. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used for the screening of the potential biomarkers in the rat serum and their related metabolic pathways. The results showed that LRWE reduced the AWR score, decreased FWC, and alleviated visceral sensitivity and diarrhea symptoms in IBS-D rats. HE and PAS staining showed that LRWE mitigated low-grade intestinal inflammation and increased the number of mature secretory goblet cells in the colonic epithelium of IBS-D rats. A total of 25 potential biomarkers of LRWE in treating IBS-D were screened out in this study, which were mainly involved in riboflavin, tryptophan, glycine, serine and threonine metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and cysteine and methionine metabolism. The regulatory effects were the most significant on the riboflavin and tryptophan metabolism pathways. LRWE may alleviate the visceral hypersensitivity by promoting energy metabolism and amino acid metabolism, enhancing intestinal barrier function, and improving intestinal immune function in IBS-D rats.

[Key words] Linderæ Radix water extract; diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; metabolomics; potential biomarkers; riboflavin metabolism; tryptophan metabolism

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230614.701

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种非器质性病变的功能性胃肠道疾病,以持续或间歇性腹痛或腹部不适、排便频率、粪便性状改变等为主要特征<sup>[1]</sup>。根据罗马IV分型标准,IBS分为4种亚型,其中以腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)最为常见<sup>[2]</sup>。目前,临床上治疗IBS-D主要以益生菌、抗菌药物、质子泵抑制剂等药物为主,存在疗效不理想,长期使用易给患者带来不良反应等问题<sup>[3]</sup>。因此,寻找或开发新的IBS-D治疗药物迫在眉睫。中药相较于西药有多成分、多靶点、多途径的特点,对IBS多因素致病、多症状重叠等特征具有显著的治疗优势。

IBS-D在中医学上属于“泄泻”范畴,其病因多涉及外感六邪、情志所伤、饮食失调、脏腑功能不足或偏颇等<sup>[4]</sup>。虽五脏六腑皆可致病,然其病位主要在肝、脾二脏,肝郁脾虚是IBS-D最常见的病机,临床常用理气健脾类方药进行治疗<sup>[5]</sup>。乌药属于理气药,具有行气止痛、温肾散寒的功效,其对胸腹诸痛等症状有较好的改善作用。本课题组前期对乌药化学成分、药理药效等方面进行了研究<sup>[6-9]</sup>,发现乌药水提物(Linderæ Radix water extract, LRWE)可通过升高IBS-D大鼠血清中促胰液素水平,降低P物质、胃动素水平改善IBS-D大鼠腹痛、腹泻等症状<sup>[8]</sup>。前期研究证实LRWE防治IBS-D疗效确切,但其作用机制仍有待进一步深入研究。

代谢组学是一门新兴的组学技术,其研究对象主要包括相对分子质量小于1 000且具有生物活性

的代谢物,被视为最接近表型的组学。由于它能真实和直观地反映机体对刺激的综合响应,因而被广泛地应用于疾病诊断、生物标志物筛选、发病机制研究、药效研究、个性化治疗等领域。本研究应用超高效液相色谱串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)技术对LRWE干预IBS-D大鼠血清进行代谢组学研究,筛选潜在生物标志物和相关代谢通路,分析LRWE对潜在生物标志物的调控作用,以期阐明乌药防治IBS-D的作用机制提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 18只SPF级雄性SD大鼠,体质量35~55 g,2周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号SYXK(湘)2019-0009,饲养于湖南中医药大学实验动物中心,室温(23±2)℃,相对湿度60%~70%,昼夜交替12 h/12 h。大鼠适应性饲养5 d后进行实验,动物实验经湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会批准(伦理编号LL2021012701)。

**1.2 药材与试剂** 乌药(批号2020062002)和番泻叶(批号2020091702)均购自湖南三湘中药饮片有限公司,经湖南中医药大学第一附属医院张裕民教授鉴定为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的干燥块根和豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥叶,均符合《中国药典》(2020年版)收载标准。质谱级甲醇(批号A454-4L)、乙腈(批号A996-4L)购自美国 ThermoFisher Scientific

公司;色谱级甲酸(批号 50144)购自美国 Honeywell Fluka 公司;甲酸氨(批号 17843, 250 g)购自玛迪卡科技(北京)有限公司;PBS 缓冲液(批号 PB180327)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;4%多聚甲醛(批号 BL539A)购自广州赛国生物科技有限公司;苏木素染液(批号 AWI0020a)和伊红染液(批号 AWI0020b)购自长沙艾碧维生物科技有限公司;二甲苯(批号 10023418)和高碘酸(批号 80098516)购自国药集团化学试剂有限公司;超纯水由 FLB00003057 超纯水制备系统制得。

**1.3 仪器** Waters 2D 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Q Exactive™ HF 高分辨率质谱仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司);Centrifuge 5430 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);QL-901 涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Maxi Vac-beta 冷冻真空浓缩仪(丹麦 GENE 公司);FLB00003057 超纯水制备系统(英国 ELGA 公司);Basis Hei-VAP ML 旋转蒸发器(德国 HEIDOLPH 公司);EG1160 组织病理包埋仪(德国 Leica 公司);YD-315 组织病理切片机(金华益迪试验器材公司);DMi8C 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 LRWE 制备** 参考课题组前期文献制备方法<sup>[10]</sup>,取乌药饮片 540.0 g,加入 8 倍体积的水将乌药浸泡 30 min 后,煎煮 1 h,过滤;再次加入 6 倍体积的水,继续煎煮 1 h,过滤;将 2 次滤液合并,旋转蒸发器(65 r·min<sup>-1</sup>, 60 °C)浓缩至稠浸膏备用,用时折算成生药量进行配制。

**2.2 番泻叶水浸液制备** 参考文献方法<sup>[11]</sup>,称取番泻叶 300.0 g,按照 1:4 的料液比加入沸水将番泻叶浸泡 30 min 后过滤;然后,再按照上述方法分别再浸泡 3 次,过滤;合并前后 4 次滤液、混匀;将番泻叶水浸液减压浓缩至 0.6 g·mL<sup>-1</sup>,4 °C 保存备用。

**2.3 造模、分组与给药** 适应性饲养结束后,按照区组随机分组法将 18 只 SD 大鼠分成对照组(control)组 6 只,模型组 12 只。采用“番泻叶灌胃联合束缚应激”的方法制备 IBS-D 大鼠模型<sup>[12]</sup>:灌胃 3.0 g·kg<sup>-1</sup>番泻叶水浸液,1 h 后将大鼠装进自制束缚装置进行束缚,每日束缚 1 次,每次持续 1 h,造模期为 14 d。将造模成功的 12 只大鼠随机分为 IBS-D 组及 LRWE 干预组,每组各 6 只;LRWE 干预组大鼠给予 LRWE 5.4 g·kg<sup>-1</sup>灌胃 14 d,control 组和 IBS-D 组

大鼠给予等体积蒸馏水,灌胃 14 d。

**2.4 样本收集与处理** 末次给药后,所有大鼠禁食不禁水 24 h,麻醉,腹主动脉采血后处死。采集的血液样本室温静置 1 h 后,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min, 4 °C),取上清分装至无菌冻存管,液氮淬灭,转移至-80 °C 冰箱备用。采血结束后,迅速收集各组大鼠的结肠组织,生理盐水淋洗干净后,浸泡于 4%多聚甲醛中备用。

**2.5 大鼠内脏敏感性** 在给药第 7、14 天后,各组大鼠禁食不禁水 24 h,分别对其进行结肠扩张刺激实验,具体操作如下:将规格大小为 8 Fr 的儿童双腔导尿管末端缓慢插入大鼠结肠中,大鼠在特制透明塑料盒中适应 30 min 后,随即分别向导尿管中充入 1.0、1.5、2.0 mL 的空气扩张大鼠结肠,对其产生刺激作用。参考文献进行腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分<sup>[13]</sup>,评估各组大鼠内脏敏感性变化。结肠扩张刺激实验重复 3 次,由 2 名独立观察者进行观察、记录和 AWR 评分。

**2.6 大鼠粪便含水率** 测定各组大鼠粪便含水率(fecal water content, FWC)变化,评价 LRWE 对 IBS-D 大鼠腹泻症状的改善作用。在给药第 7、14 天,收集各组大鼠 12 h 内自由排出的粪便,进行称量、记录粪便湿重。然后,将粪便放入烘箱(60 °C, 4 h)干燥直至恒重,称量粪便干重。计算 FWC=(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重×100%。

**2.7 结肠组织 HE 和 PAS 染色** 大鼠结肠组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,依次进行脱水、透明、包埋,每份样本切取 2 份 5 μm 左右的石蜡片进行烘烤;然后,将脱蜡后的切片分别用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和过碘酸席夫(periodic acid-schiff, PAS)染色;最后,将染色后的切片置于光学显微镜下,分别观察各组大鼠结肠组织形态及杯状细胞数量变化。

**2.8 血清样本提取和前处理** 分别取各组血清样本 100.0 μL 缓慢解冻,加入 300.0 μL 预冷的甲醇和乙腈(2:1 体积比)及 10.0 μL 内标,涡旋 1 min 沉淀蛋白,4 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 20 min;取 300.0 μL 上清液,置于冷冻真空浓缩仪抽干,加入 150.0 μL 复溶液(甲醇-水 1:1 体积比)进行复溶,涡旋振荡 1 min,4 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 30 min;取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, UPLC-MS/MS 进样分析。此外,在每个样本的上清液中各取 10.0 μL 混

合成质控(QC)样本,用于评估UPLC-MS/MS分析过程的稳定性。

**2.9 UPLC-MS/MS分析** 色谱条件如下,Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);正离子模式下,流动相由0.1%甲酸(A)和乙腈(B)组成;负离子模式下,流动相由10 mmol·L<sup>-1</sup>甲酸铵(A)和乙腈(B)组成。采用以下梯度进行洗脱:0~1 min,2% B;1~9 min,2%~98% B;9~12 min,98% B;12~12.1 min,98%~2% B;12.1~15 min,2% B。体积流速0.35 mL·min<sup>-1</sup>,柱温45℃,进样量5.0 μL。

质谱条件如下,利用Q Exactive™ HF质谱仪进行一级、二级质谱数据采集。质谱扫描质核比范围为70~1 050,一级分辨率设置为120 000,离子自动增益控制(AGC)为3×10<sup>6</sup>,最大注入时间(IT)为100 ms。按照母离子强度,选择排前3的离子进行断裂,采集二级信息,二级分辨率设置为30 000,AGC为3×10<sup>5</sup>,最大IT为50 ms,碰撞能量设置为20、40、60 eV。干燥气为氮气,离子源参数设置如下,鞘气流速40 L·min<sup>-1</sup>,辅助气流速10 L·min<sup>-1</sup>,正、负离子模式下的喷雾电压分别为3.80、-3.20 kV,离子传输管温度320℃,辅助气加热温度350℃。

**2.10 数据预处理和代谢物鉴定** 将UPLC-MS/MS采集的数据导入Compound Discoverer 3.1软件,对谱图进行峰的提取、组内及组间的保留时间校正、加合离子合并、缺失值填充、背景峰标记以及代谢物鉴定等操作,然后导出化合物相对分子质量、保留时间、峰面积和鉴定结果等数据。将上述导出的数据再导入metaX软件进行归一化、校正批次效应,去除背景离子等系列处理。最后,保存导出的数据,并作进一步整理、分析。

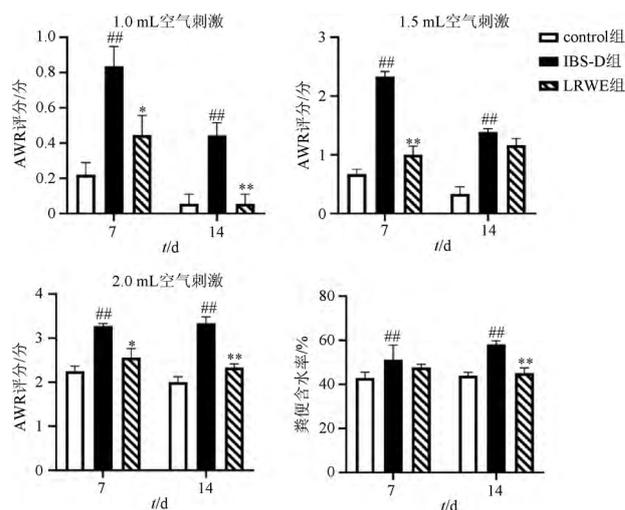
将整理好的数据导入SIMCA-P 14.1软件进行多维统计分析,包括无监督模式的主成分分析(principal component analysis,PCA),有监督模式的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminat analysis,OPLS-DA)。采用200次响应排序检验对模型进行置换验证。在上述分析基础上,计算出变量投影重要度(variable important for the projection,VIP);基于单变量统计分析和变化倍数分析,分别计算出各代谢物在2组间的P和差异倍数(fold change,FC)。设置差异代谢物筛选的标准为VIP>1,P<0.05,FC≥1.2,筛选得到潜在生物标志物。

利用HMDB数据库(<http://www.hmdb.ca/>)与KEGG数据库(<http://www.kegg.ca/>)对潜在生物标志物进行鉴定;使用MetaboAnalyst 5.0数据库(<http://www.metaboanalyst.ca/>)对潜在生物标志物进行代谢通路富集分析。

**2.11 统计分析** 使用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。若满足正态性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐用LSD,方差不齐用Dunnet T3分析;若不满足正态性检验,多组间比较采用秩和检验;组间比较采用独立样本t检验;统计结果P<0.05说明有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 LRWE对IBS-D大鼠内脏敏感性和腹泻症状的影响** 本研究通过结肠扩张实验结合AWR评分观察各组大鼠内脏敏感性变化。LRWE干预7 d后,与control组相比,IBS-D大鼠AWR评分显著增加;与IBS-D组比较,LRWE组大鼠AWR评分显著降低;LRWE干预14 d后,与IBS-D组相比,LRWE组大鼠AWR评分降低。上述结果说明,LRWE能改善IBS-D大鼠内脏高敏性。给药7、14 d后,分别测定各组大鼠FWC,与control组比较,IBS-D大鼠FWC显著增加;LRWE干预14 d后,与IBS-D组相比,LRWE组大鼠FWC显著降低,提示LRWE能改善IBS-D大鼠的腹泻症状,见图1。



control. 对照;IBS-D. 腹泻型肠易激综合征;LRWE. 乌药水提取物(图2~5、表1同);与control组比较<sup>#</sup>P<0.05,<sup>##</sup>P<0.01;与IBS-D组比较<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01。AWR. 腹壁撤退反射。

图1 乌药水提取物对IBS-D大鼠内脏敏感性和腹泻症状的影响( $\bar{x}\pm s$ ,n=6)

Fig. 1 Effects of Linderae Radix water extract on visceral sensitivity and diarrhea symptoms in IBS-D rats ( $\bar{x}\pm s$ ,n=6)

**3.2 LRWE 对 IBS-D 大鼠结肠组织形态及杯状细胞数量的影响** HE 染色所示, 各组大鼠结肠组织未见明显损伤, 形态完好, 结构正常, 肠上皮细胞排列整齐, 腺体结构规则, 黏膜下无充血、水肿。与 control 组比较, IBS-D 大鼠结肠固有层存在炎症细胞浸润, 提示 IBS-D 大鼠结肠组织存在低度炎症。与 IBS-D 组比较, LRWE 组未见炎症细胞浸润, 与 control 组相比差异无统计学意义。PAS 染色显示, control 组大鼠结肠组织中杯状细胞结构完整, 多为成熟分泌态, 有序排列在腺体周围形成黏液层。与 control 组相比, IBS-D 大鼠结肠中成熟分泌态杯状细胞数量明显减少; 与 IBS-D 组比较, LRWE 组大鼠结肠组织中成熟分泌态杯状细胞数量明显增多, 且均匀分散于腺体两侧, 提示 LRWE 可通过增加 IBS-D 大鼠结肠中成熟分泌态杯状细胞数量, 增强肠道屏障功能, 见图 2。

**3.3 UPLC-MS/MS 分析方法稳定性** 为保证检测

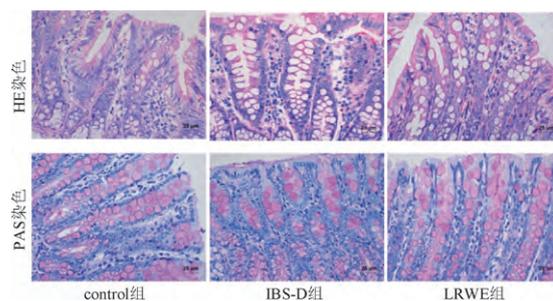


图2 乌药水提取物对 IBS-D 大鼠结肠组织形态及杯状细胞数量的影响( $\times 400$ )

Fig. 2 Effects of Linderae Radix water extract on the colonic histopathologic and goblet cell number in IBS-D rats ( $\times 400$ )

仪器分析方法稳定性, 本研究对质控 (quality control, QC) 样本进行无监督模式的 PCA 分析。PCA 一维分布图显示, QC 样本聚集性强且全部位于 2 倍标准偏差范围内, 表明该方法具有良好的稳定性, 实验获取的数据稳定、可靠, 见图 3。

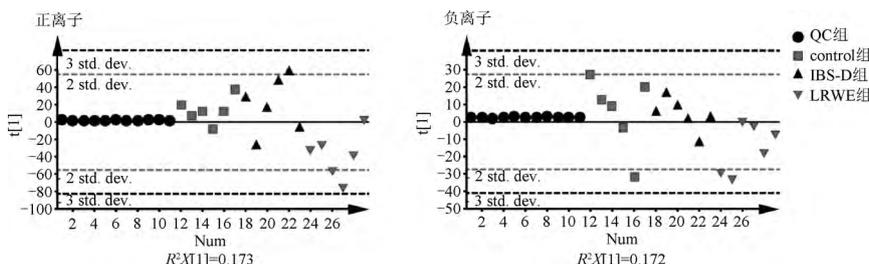


图3 正、负离子模式下质控样本一维 PCA 分析

Fig. 3 One-dimensional PCA plots of quality control samples in positive and negative modes

**3.4 多元统计分析** PCA 结果见图 4, 正、负离子模式下, 各组样本之间虽存在一定的交叉, 但 control 组与 IBS-D 组样本、LRWE 组与 IBS-D 组样本可明显分开, 表明 IBS-D 大鼠血清中代谢物发生了明显的变化, 而 LRWE 能够缓解这种改变。进一步采用有监督的 OPLS-DA 方法进行组间比较, 发现正、负离子模式下, IBS-D 组与 control 组、LRWE 组与 IBS-D 组之间均能很好分离。正离子模式下, IBS-D 组与 control 组 ( $R^2X = 0.4$ ,  $R^2Y = 0.997$ ,  $Q^2 = 0.421$ ); LRWE 组与 IBS-D 组 ( $R^2X = 0.447$ ,  $R^2Y = 0.999$ ,  $Q^2 = 0.722$ )。负离子模式下, IBS-D 组与 control 组 ( $R^2X = 0.419$ ,  $R^2Y = 0.994$ ,  $Q^2 = 0.254$ ); LRWE 组与 IBS-D 组 ( $R^2X = 0.453$ ,  $R^2Y = 0.995$ ,  $Q^2 = 0.632$ )。

5360

OPLS-DA 模型置换检验结果见图 5, 正、负离子模式下, IBS-D 组与 control 组  $Q^2$  的回归线截距分别为  $-0.03$ 、 $-0.02$ ; LRWE 组与 IBS-D 组  $Q^2$  的回归线截距分别为  $-0.07$ 、 $-0.02$ 。所有模拟值均小于真实值, 且  $Q^2$  的回归线截距均小于 0.05。该结果表明, OPLS-DA 模型具有良好的拟合度和预测能力, 不存在过拟合现象。

**3.5 潜在生物标志物筛选** 通过单变量统计分析和多变量分析所获得的重要参数 (VIP、FC、P), 设定差异代谢物筛选条件  $VIP \geq 1$ ,  $FC \geq 1.2$ ,  $P < 0.05$ , 对各组大鼠正、负离子模式下血清代谢物进行筛选, 获得组间差异具有统计学意义和生物学意义的差异代谢物。将它们的二级质谱图分别与 HMDB 数据库、KEGG 数据库中代谢物的二级质谱图进行匹配,

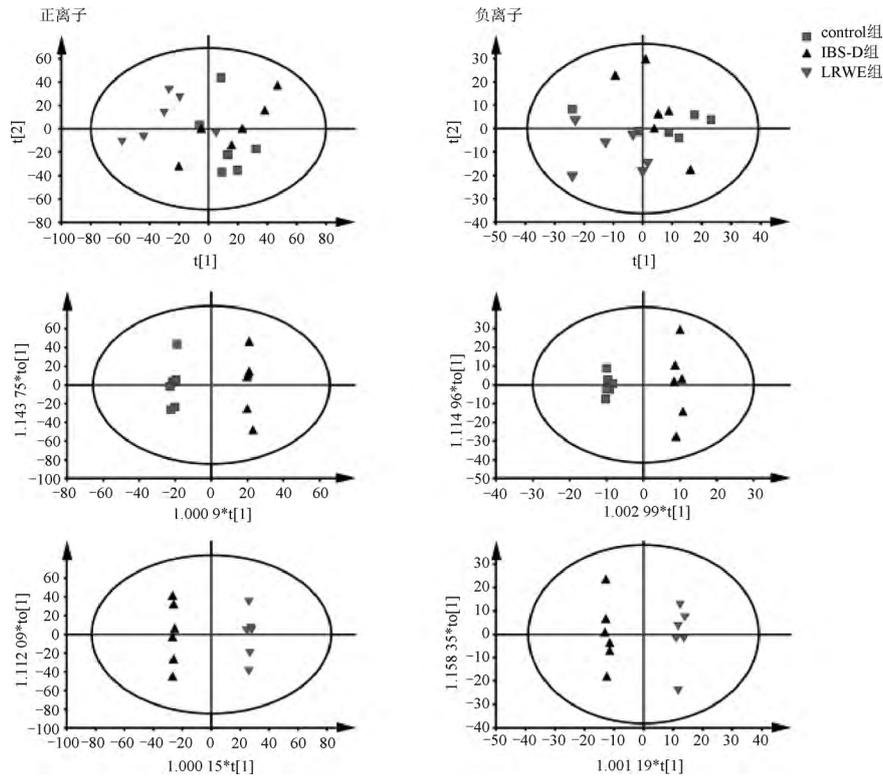


图4 各组大鼠血清代谢物的多元统计分析  
Fig. 4 Multivariate statistical analysis of serum metabolites in each group

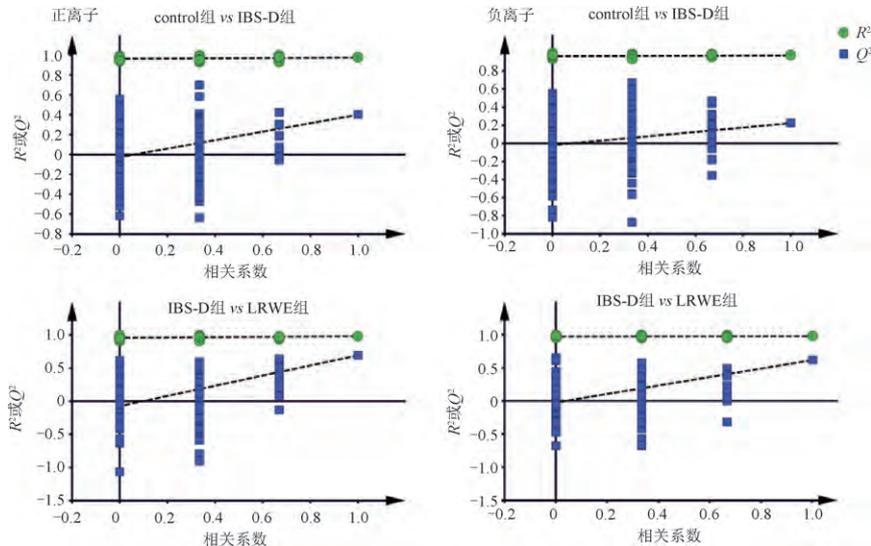


图5 不同组别比较下 OPLS-DA  
Fig. 5 OPLS-DA plots for comparison between different groups

反复比对,最终确定 25 种潜在生物标志物,见表 1。与 control 组相比,IBS-D 组有 8 种代谢物发生显著性上调,17 种代谢物发生显著性下调,而在 LRWE 干预下这些潜在生物标志物向正常水平回调。

**3.6 代谢通路分析** 将筛选得到的 25 个潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路富集分析,设定代谢通路影响值 impact value  $\geq 0.1$  作为筛选标准,富集分析得到 5 条代谢通路,见图 6、

表1 各组间潜在生物标志物种类及变化趋势

Table 1 Potential biomarkers in each group and their variation trend

No.	<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> /min	离子 模式	VIP	HMDB ID	分子式	代谢物	IBS-D <i>vs</i> control	LRWE <i>vs</i> IBS-D
1	560.35	9.58	+	1.66	HMDB0014884	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	去铁胺	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
2	456.10	5.95	+	2.97	HMDB0001520	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P	黄素单核苷酸	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
3	349.30	9.98	+	1.15	HMDB0013625	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	二高-γ-亚麻酰乙醇酰胺	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
4	332.24	8.91	-	1.40	HMDB0000363	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	17α-羟基孕烯醇酮	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
5	330.22	7.40	+	1.48	HMDB0000016	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	脱氧皮质酮	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
6	302.22	9.65	-	1.74	HMDB0001999	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	二十碳五烯酸	↓ <sup>2)</sup>	↑ <sup>4)</sup>
7	290.22	9.70	-	1.23	HMDB0002961	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	二氢睾酮	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
8	283.29	9.94	+	1.39	HMDB0034146	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	十八酰胺	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
9	236.08	4.13	+	1.73	HMDB0001200	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	N'-甲酰基犬尿氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
10	232.12	4.66	+	2.08	HMDB0001389	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	褪黑素	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
11	219.11	3.04	+	1.33	HMDB0000210	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	泛酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
12	208.08	2.41	+	1.24	HMDB0000684	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L-犬尿氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
13	205.06	6.19	+	1.19	HMDB0000962	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NOS <sub>2</sub>	脂酰胺	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
14	204.09	2.99	-	1.49	HMDB0000929	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L-色氨酸	↑ <sup>1)</sup>	↓ <sup>3)</sup>
15	200.18	9.07	-	1.02	HMDB0000638	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	十二烷酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
16	193.07	4.18	+	1.04	HMDB0000821	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	苯乙酰甘氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
17	177.05	3.18	+	1.55	HMDB0001015	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	N-甲酰基-L-蛋氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
18	159.07	1.50	+	1.03	HMDB0001190	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO	吡啶乙醛	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
19	156.07	3.28	+	1.25	HMDB0006524	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	3-吡啶乙腈	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
20	149.05	1.02	+	1.02	HMDB0000696	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	L-蛋氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
21	145.07	3.34	+	1.48	HMDB0003681	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	4-乙酰氨基丁酸	↓ <sup>2)</sup>	↑ <sup>4)</sup>
22	135.07	3.32	+	1.56	HMDB0001250	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO	N-乙酰芳胺	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
23	131.09	1.67	+	1.21	HMDB0001645	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L-去甲基亮氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>
24	116.01	3.58	-	1.81	HMDB0000176	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	马来酸	↓ <sup>2)</sup>	↑ <sup>4)</sup>
25	75.03	3.30	-	1.20	HMDB0000123	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	甘氨酸	↓ <sup>1)</sup>	↑ <sup>3)</sup>

注: ↑. 含量上升; ↓. 含量下降; 与 control 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 IBS-D 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

表2,分别为核黄素代谢,色氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢;其中,核黄素代谢影响因子最高,色氨酸代谢次之,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢再次之,但显著性较强的代谢通路仅有2条,分别为色氨酸代谢、核黄素代谢。由此说明,LRWE 防治 IBS-D 的作用机制可能与调控核黄素代谢、色氨酸代谢密切相关。

#### 4 讨论

IBS-D 是一种多症状重叠的功能性胃肠道疾病,临床上缺乏生化指标和影像学检查的诊断依据。IBS-D 发病机制尚未完全阐明,研究表明其与内脏高敏感性、胃肠动力异常、肠道菌群失调、免疫功能异常、机体代谢紊乱等有关<sup>[14]</sup>。制备稳定、可靠、易重复的 IBS-D 动物模型是研究其发病机制的关键。目前,IBS-D 动物模型的制备主要采用多因素联合刺激,常用“乙酸灌肠联合束缚应激”“母婴分离联合乙酸灌肠”“番泻叶灌胃联合束缚应激”等方

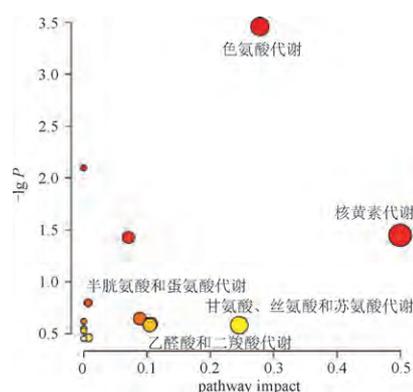


图6 乌药水提取物对 IBS-D 模型大鼠血清代谢通路的影响

Fig. 6 Effect of Linderæ Radix water extract on the serum metabolic pathway of IBS-D model rats

法<sup>[12,15-16]</sup>。本研究通过“番泻叶灌胃联合束缚应激”制备 IBS-D 模型大鼠,结果显示模型大鼠出现腹泻、内脏高敏感性等症状,说明该造模方法可用于 IBS-D 机制研究。用 LRWE 进行干预治疗后,IBS-D 大鼠

表2 代谢通路分析

Table 2 Metabolic pathway analysis

通路名称	匹配状态	raw <i>P</i>	-lg <i>P</i>	Holm <i>P</i>	FDR	impact
色氨酸代谢	4/41	4.5×10 <sup>-4</sup>	3.5	0.029	0.029	0.28
核黄素代谢	1/4	0.036	1.4	1.0	0.78	0.50
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	1/33	0.26	0.58	1.0	1.0	0.25
乙醛酸和二羧酸代谢	1/32	0.25	0.59	1.0	1.0	0.11
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	1/33	0.26	0.58	1.0	1.0	0.10

注:raw *P*. 通路分析得出的原始 *P*; Holm *P*. 用 Holm-Bonferroni 法校正后的 *P*; FDR. 通过错误发现率校正后的 *P*; impact. 通过拓扑分析得到的通路影响值。

腹泻、内脏高敏性症状、肠道低度炎症显著改善,结肠上皮中成熟分泌态杯状细胞数量明显增加,提示 LRWE 对 IBS-D 有良好的防治作用,与前期研究结果一致。

为进一步探讨 LRWE 防治 IBS-D 的作用机制,本研究采用 UPLC-MS/MS 技术对大鼠血清进行代谢组学分析。研究结果显示,与 IBS-D 组相比,LRWE 可使去铁胺、黄素单核苷酸、褪黑素等 25 种潜在生物标志物明显回调,表明 LRWE 可以调节代谢紊乱,促进 IBS-D 大鼠代谢水平趋于正常;同时,对这 25 种潜在生物标志物进行代谢通路富集分析,共得到 15 条代谢通路,其中,核黄素代谢、色氨酸代谢这 2 条代谢通路影响度大,显著性较强。

核黄素是一种水溶性维生素,一般作为辅酶、黄素腺嘌呤二核苷酸和黄素单核苷酸的前体参与并改善线粒体能量代谢,清除自由基对线粒体功能的损害,对线粒体产生保护作用<sup>[17]</sup>。核黄素在黄素激酶作用下代谢成黄素单核苷酸,继而通过黄素腺嘌呤二核苷酸合成酶代谢成黄素腺嘌呤二核苷酸,它们在黄酮糖蛋白参与 DNA 修复、染色质重塑、蛋白质折叠、凋亡等生理过程中扮演着关键的角色<sup>[17-18]</sup>。黄素单核苷酸作为本研究筛选出的潜在生物标志物,在细胞呼吸、脂肪酸氧化、糖类分解等能量代谢过程中同样发挥着重要作用。黄莹莹等<sup>[19]</sup>研究发现,黄素单核苷酸与 FWC、结肠中血管活性肠肽(VIP)、5-羟色胺(5-HT)等指标呈显著正相关性。IBS-D 大鼠血清中 5-HT、VIP 等神经递质水平异常升高<sup>[20]</sup>;5-HT 与内脏敏感性、肠道免疫、胃肠动力等 IBS-D 发病机制密切相关<sup>[21-22]</sup>;VIP 通过抑制胃肠道平滑肌收缩,影响小肠中水电解质的分泌,导致患者出现腹痛、腹泻等症状<sup>[23]</sup>。本研究中 LRWE 可回调 IBS-D 大鼠血清黄素单核苷酸相对水平,由此提示,LRWE 可能通过调控核黄素代谢间接影响

5-HT、VIP 等神经递质的分泌,改善 IBS-D 大鼠腹痛、腹泻等症状。

色氨酸代谢紊乱与 IBS-D 发生密切相关<sup>[24]</sup>。色氨酸在机体中有 3 条代谢通路,色氨酸及其代谢产物一般通过旁分泌、芳香烃受体等途径来调控肠道屏障免疫功能,促进机体肠道稳态<sup>[25-26]</sup>。本研究筛选得到 4 种潜在生物标志物(色氨酸、褪黑素、犬尿氨酸、吲哚乙醛),均为色氨酸代谢通路上的重要组成。其中,褪黑素是一种由松果体产生的胺类激素,它在维持机体正常睡眠精神状态,改善胃肠道功能、肠道免疫等方面具有重要作用<sup>[27]</sup>。研究发现,IBS 患者血清犬尿氨酸浓度升高,犬尿氨酸与色氨酸比值与 IBS 严重程度呈正相关<sup>[24]</sup>。犬尿氨酸下游产物可以通过与肠道上皮细胞及免疫细胞中的 G 蛋白偶联受体结合,对肠道免疫发挥调控作用,维持肠道屏障功能稳态。SCOTT S 等<sup>[28]</sup>研究发现,吲哚乙醛等吲哚衍生物可通过激活芳香烃受体信号来上调肠道紧密连接蛋白表达,降低肠道炎症反应,改善肠道屏障功能。大量研究表明,中药可通过调控色氨酸代谢来改善机体肠道免疫功能和肠道屏障功能,缓解肠道疾病的一系列症状<sup>[29-30]</sup>。由此推测,LRWE 可能通过调节色氨酸代谢来影响肠道免疫,改善 IBS-D 大鼠肠道轻度炎症。

综上所述,本研究基于 UPLC-MS/MS 技术从血清代谢组学角度探讨 LRWE 防治 IBS-D 的作用机制,发现 LRWE 对 IBS-D 大鼠血清中 25 种潜在生物标志物具有调控作用,显著影响了核黄素代谢、色氨酸代谢等代谢通路,可能通过促进 IBS-D 大鼠能量代谢及氨基酸代谢,增强肠道屏障功能、改善肠道免疫功能,从而发挥改善内脏高敏性、腹泻、肠道低度炎症等作用。本研究为阐明乌药防治 IBS-D 的作用机制提供了科学依据和新思路。

## [参考文献]

- [1] VERGNOLLE N. Abdominal pain in irritable bowel syndrome [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(6): 350.
- [2] OKA P, PARR H, BARBERIO B, et al. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(10): 908.
- [3] CAMILLERI M. Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome: a review [J]. *J Am Med Assoc*, 2021, 325(9): 865.
- [4] 程健, 余莹, 何君君. 腹泻型肠易激综合征中医“肝郁脾虚”本质的探讨与思考 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5698.
- [5] 陈敏, 谢欣, 石云舟, 等. 中医药治疗腹泻型肠易激综合征的比较效果研究现状及思考 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25(15): 1795.
- [6] 欧阳林旗, 蒋司晨, 陈镇, 等. 乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证大鼠血液流变学及 NO-sGC-cGMP 信号通路的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(15): 4730.
- [7] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于网络药理学的乌药主要化学成分药效作用研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(21): 5125.
- [8] 肖小芹, 舒圆月, 邓桂明, 等. 乌药水提液对腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Ghrelin、MTL、SP、Sec 水平的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(5): 477.
- [9] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-ESI-MS/MS 法研究乌药化学成分 [J]. *中药材*, 2016, 39(10): 2229.
- [10] 舒圆月. 乌药水提液对 IBS-D 大鼠胃肠功能及脑肠肽水平的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [11] 管志伟, 赵琼, 赵中和, 等. 番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型量-时-效关系研究 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(8): 1806.
- [12] ZHU H, LI L, LI S, et al. Effect of water extract from *Berberis heteropoda* Schrenk roots on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by adjusting intestinal flora [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 182.
- [13] AL-CHAER E, KAWASAKI M, PASRICHA P. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276.
- [14] FORD A, SPERBER A, CORSETTI M, et al. Irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1675.
- [15] PEI L P, SONG J Z, LIU W, et al. Effect of water extracts from *Cynanchum thesioides* (Freyn) K. Schum. on visceral hypersensitivity and gut microbiota profile in maternally separated rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113352.
- [16] XIE Y, ZHAN X, TU J Y, et al. Atractylodes oil alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by regulating intestinal inflammation and intestinal barrier via SCF/c-kit and MLCK/MLC2 pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272: 113925.
- [17] AVERIANOVA L, BALABANOVA L, SON O, et al. Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: an overview [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 570828.
- [18] SHANTI B, JOHN C, SHAMIMA R. Disorders of riboflavin metabolism [J]. *J Inher Metab Dis*, 2019, 42(4): 608.
- [19] 黄莹莹, 杨婷, 王琪琪, 等. 基于粪便代谢组学与燥性相关性探究岭南特色饮片制枳壳的炮制缓燥作用 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(1): 82.
- [20] WU H M, ZHAN K, RAO K H, et al. Comparison of five diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rat models in the brain-gut-microbiota axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149: 112811.
- [21] CHANG W Y, YANG Y T, SHE M P, et al. 5-HT receptor-dependent intestinal neurite outgrowth contributes to visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(9): 1023.
- [22] YU L J, HUANG C H, YANG W, et al. Aqueous cinnamon extract ameliorates bowel dysfunction and enteric 5-HT synthesis in IBS rats [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1010484.
- [23] DEL VALLE-PINERO A, SHERWIN L, ANDERSON E, et al. Altered vasoactive intestinal peptides expression in irritable bowel syndrome patients and rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 155.
- [24] CHOJNACKI C, BLONSKA A, KONRAD P, et al. Changes in tryptophan metabolism on serotonin and kynurenine pathways in patients with irritable bowel syndrome [J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1262.
- [25] AGUS A, PLANCHAIS J, SOKOL H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6): 716.
- [26] 杨刚, 张云露, 李思明, 等. 色氨酸对肠屏障免疫的调控作用研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(4): 6.
- [27] FOWLER S, HOEDT E, TALLEY N, et al. Circadian rhythms and melatonin metabolism in patients with disorders of gut-brain interactions [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 825246.
- [28] SCOTT S, FU J J, CHANG P V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(32): 19376.
- [29] 刘涛, 欧阳林旗, 陈镇, 等. 中药调控色氨酸-肠道菌群代谢治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(2): 324.
- [30] LUO S, WEN R Y, WANG Q, et al. Rhubarb peony decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231: 39.

[责任编辑 陈玲]