

本文引用: 刘艺璇, 吴昊洋, 罗政, 蔡昱哲, 邓奕辉, 李定祥. 基于 UPLC-QE-MS 代谢组学探讨青钱柳治疗糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1959-1967.

## 基于 UPLC-QE-MS 代谢组学探讨青钱柳治疗糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠的作用机制

刘艺璇<sup>1,2</sup>, 吴昊洋<sup>3</sup>, 罗政<sup>1,2</sup>, 蔡昱哲<sup>1,2</sup>, 邓奕辉<sup>2</sup>, 李定祥<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 3. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

**〔摘要〕** **目的** 应用非靶向肝脏代谢组学探讨青钱柳对糖尿病合并脂肪肝大鼠的作用机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、青钱柳组( $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 6 只, 建立糖尿病合并非酒精性脂肪肝动物模型, 连续灌胃 4 周后取材。采用全自动生化分析仪测定大鼠空腹血糖(fasting blood sugar, FBS)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC); ELISA 法检测肝组织谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)含量; HE 染色观察肝组织病理形态学; 油红 O 染色观察肝脏脂质蓄积; 过碘酸雪夫氏(periodic acid-schiff stain, PAS)染色观察肝脏糖原及其他多糖类物质分布情况, 并通过肝脏代谢组学分析差异代谢通路及相关靶点。**结果** 与模型组相比, 青钱柳可以显著增加模型大鼠肝组织的 GSH、SOD 水平, 显著降低 FBS、TG、ALT、AST 指标水平( $P<0.001$ ), 并减轻肝脏脂质沉积。通过代谢组学分析确定了 8 个生物标志物及 1 条主要的代谢通路。**结论** 青钱柳可以减轻糖尿病合并脂肪肝大鼠肝脂沉积与血糖水平, 其机制可能与调节丁酸代谢有关。

**〔关键词〕** 代谢组学; 青钱柳; 2 型糖尿病; 非酒精性脂肪肝; 丁酸代谢

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.004

## Mechanism of action of *Cyclocarya paliurus* in treating diabetic rats with nonalcohol fatty liver disease based on UPLC-QE-MS metabolomics

LIU Yixuan<sup>1,2</sup>, WU Haoyang<sup>3</sup>, LUO Zheng<sup>1,2</sup>, CAI Yuzhe<sup>1,2</sup>, DENG Yihui<sup>2</sup>, LI Dingxiang<sup>2\*</sup>

1. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China.

**〔Abstract〕** **Objective** The application of non-targeted hepatic metabolomics and animal experiments was utilized to investigate the mechanisms by which *Cyclocarya paliurus* ameliorates diabetic fatty liver. **Methods** SD rats were randomly assigned to control, model, and *Cyclocarya paliurus* group ( $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with six rats in each group. An animal model of diabetes mellitus combined with non-alcoholic fatty liver disease was established, and tissue samples were collected after four weeks of

**〔收稿日期〕** 2024-04-10

**〔基金项目〕** 国家自然科学基金面上项目(81874416); 湖南省科技创新计划资助(2020RC4050); 湖南省卫生健康委员会科研课题(D202303067824); 长沙市自然科学基金项目(kq2208188); 湖南省研究生科研创新项目(CX20220787)。

**〔通信作者〕** \* 李定祥, 男, 博士, 副教授, E-mail: ldxlzy@hotmail.com。

continuous gavage. Fasting blood sugar (FBS), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and triglyceride (TG) levels were measured using an automatic biochemical analyzer. The levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in liver tissues were quantified using ELISA. HE was employed to observe liver histopathology and morphology, while Oil Red O was used to assess liver lipid accumulation. Periodic acid-Schiff (PAS) staining was conducted to evaluate the distribution of liver glycogen and other polysaccharides. Additionally, differential metabolic pathways and related targets were analyzed through hepatic metabolomics. **Results** Compared to the model group, *Cyclocarya paliurus* significantly increased the levels of GSH and SOD in the liver tissues of the model rats, while also significantly decreasing the levels of FBS, TG, ALT, and AST ( $P < 0.001$ ), and reducing hepatic lipid deposition. Metabolomics analysis identified eight biomarkers and one major metabolic pathway. **Conclusions** *Cyclocarya paliurus* attenuates hepatic lipid deposition and blood glucose levels in rats with diabetes mellitus combined with fatty liver, potentially through the regulation of butyric acid metabolism.

[**Keywords**] metabolomics; *Cyclocarya paliurus*; type 2 diabetes mellitus; nonalcoholic fatty liver disease; butyrate metabolism

糖尿病是以高血糖为特点的代谢性疾病,其并发症可累及全身多个靶脏器功能障碍。非酒精性脂肪性肝病(nonalcohol fatty liver disease, NAFLD)与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、代谢综合征密切相关<sup>[1]</sup>,据统计超过70%的T2DM患者合并有NAFLD<sup>[2]</sup>,并且T2DM会加速NAFLD进展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化或肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[3]</sup>,被认为是NAFLD的独立危险因素。近日,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)首次批准了一种治疗NAFLD的药物,这种名为瑞司美替罗(Resmetirom)的药物是甲状腺激素受体的部分激活剂,通过增强肝脏对甲状腺激素的反应能力提高其代谢脂肪酸的能力,从而减少肝脏脂肪堆积,该药物被授予治疗伴有肝纤维化中重度NASH成人患者<sup>[4]</sup>。然而,目前尚无针对轻度肝纤维化和单纯脂肪性病变的肝脏病理变化的治疗药物。

青钱柳[*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja]是我国特有的树种和宝贵的中药资源,隶属于胡桃科、青钱柳属,广泛分布于长江以南的13个省区<sup>[5]</sup>。青钱柳的叶、皮、根都可以入药,其叶是主要活性部位,具有具有清热解毒、生津止渴等功能<sup>[6]</sup>。已有研究证明,青钱柳主要的活性成分以多糖、三萜和黄酮类为主,可通过多种途径调节糖脂代谢<sup>[7-9]</sup>,并对肝脏有保护作用,但从代谢组学角度分析其对糖尿病性脂肪肝大鼠肝脏代谢变化的报道较少,肝脏作为人体内调控糖、脂类及蛋白质代谢的枢纽器官,最能反映体内小分子生化代谢状态。因此,本研究在分

析血清生化指标以及肝组织病理切片的基础上,采用非靶向肝脏代谢组学研究青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠的干预机制,为青钱柳治疗糖尿病性脂肪肝的药效学研究提供新的思路。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠24只,体质量(210±10)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验单位使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。动物分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,通风良好,每日12h照明,温度25℃,湿度合适。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审查批准(LL2022070405)。

### 1.2 主要试剂

甲醇(CAS 67-56-1, LC-MS级, CNW Technologies); 乙腈(CAS 75-05-8, LC-MS级, CNW Technologies); 甲酸(CAS 64-18-6, LC-MS级, Sigma); 大鼠MDA测定试剂盒、SOD试剂盒、GSH-ST试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司, 货号:ZC-55718-J、ZC-36451、ZC-36690); 链脲佐菌素STZ、柠檬酸钠缓冲液(索莱宝公司, 货号:S8050、C1013)。

### 1.3 仪器与设备

超高效液相仪(Vanquish Thermo Fisher Scientific); 高分辨质谱仪(Orbitrap Exploris 120 Thermo Fisher Scientific); GA-3型血糖测试仪、血糖试纸(长沙Sinocare公司); Basis Hel-VAP ML旋转蒸发器(德国海道尔夫Heidolph公司); Chemray 800全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技); BioPrep-24生物

样品均质仪(中国杭州奥盛);RT-6100型酶标仪(美国 Rayto 公司);Milli-Q Biocel A10 超滤除热源纯水器;Optima MAX 台式超速离心机;RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 组织摊片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 药物制备及给药浓度

青钱柳由湖南省中药研究所提供,经湖南中医药大学翦雨青副教授鉴定为胡桃科青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja 的干燥叶片。制备方法:取 1 kg 青钱柳干燥叶片,加入 12 倍水,沸腾 2 h,过滤,滤渣再加 10 倍水,沸腾 1 h,合并 2 次滤液,滤液浓缩至 1 L,即青钱柳水提液浓度为 1 mg/mL。

青钱柳给药浓度按照人与大鼠体表面积折算,参考《贵州省中药、民族药材治疗标准(2019 年版)》与《四川省药品监督管理局中药标准》中青钱柳成人推荐用量(10 g/d)计算其临床等效剂量,即青钱柳组给药剂量为(0.9 g/kg),空白组及模型组灌胃生理盐水。灌胃 4 周后取材并检测相关指标。

### 2.2 动物分组

参考 XU 等<sup>[10]</sup>报道的造模方法,24 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后随机选 6 只大鼠作为空白组饲以普通饲料,其余 18 只大鼠予高糖高脂饲料(67%基础饲料+10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠),饲养 4 周后禁食 12 h,一次性腹腔注射链脲佐菌素(35 mg/kg),空白组腹腔注射相应体积的柠檬酸缓冲液。1 周后,随机从 18 只大鼠中选取 3 只进行肝脏病理观察,若出现一定程度的脂肪变性,胞质中出现大量脂滴空泡,并连续 2 次大鼠空腹血糖(fasting blood sugar, FBS)  $\geq 16.7$  mmol/L,两者条件均满足即为 T2DM 合并 NAFLD 模型。余下 15 只造模大鼠,随机选取 12 只大鼠,以随机数字表法将其分为模型组、青钱柳组(0.9 g/kg),每组 6 只。

### 2.3 大鼠的体质量记录及肝脏指数计算

大鼠处死前记录其体质量,处死大鼠后,取其肝脏并拍照观察肝脏表面,称量肝脏质量并计算肝脏指数,肝脏指数=肝湿重(g)/大鼠体质量(g)  $\times 100\%$ 。

### 2.4 大鼠血清 FBS、TG、TC、ALT、AST 水平

取材前 12 h 予以禁食不禁水处理。取材前用

10%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,大鼠麻醉后仰卧位固定,从腹正中线皮肤切开腹腔,腹主动脉取血 4 mL,室温静置 1 h 后,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,以 3 500 r/min 离心 15 min,分离血清,采用全自动血生化分析仪分别测定 FBS、TG、TC、ALT、AST 水平,严格按照操作说明进行。

### 2.5 大鼠肝脏 MDA、SOD、GSH 水平

收集到的肝脏用生理盐水进行清洗,并按说明书要求进行匀浆后取上清液,置冰上待测,按试剂盒说明书操作分步检测肝组织氧化应激标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)、肝组织谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平。

### 2.6 大鼠肝脏病理染色

腹主动脉取血后,用眼科剪沿肝脏外缘取下完整肝脏,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  生理盐水中浸洗,在冷冻台上用刀片切取右叶 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  3 mm 肝组织并固定于 4%多聚甲醛中,经固定-脱水-包埋-切片-脱蜡等常规步骤后,对各组大鼠肝脏标本进行染色并且在镜下进行观察、拍照。

### 2.7 代谢组学研究

2.7.1 肝组织样本处理 将 18 个肝组织样本各取 25 mg 置于离心管中,分别加入 500  $\mu\text{L}$  提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1,含同位素标记内标混合物),35 Hz 研磨后置于冰水浴上超声 5 min, -40  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h,随后离心取上清于进样瓶中上机检测。所有样品另取等量上清混合成质量控制(quality control, QC)样品上机检测。

2.7.2 色谱条件 通过 WATERS ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相,含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水, B 相为乙腈。样品盘温度 4  $^{\circ}\text{C}$ ,进样体积 2  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱(0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65% B~40% B; 8~9 min, 40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样盘温度 4  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 0.5 mL/min。

2.7.3 质谱条件 Orbitrap Exploris 120 质谱仪在软件(Xcalibur, 版本 4.4, Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:鞘气流速 50 Arb,

辅助气流速15 Arb,毛细管温度 320 ℃,全 MS 分辨率(full MS resolution)为 60 000,MS/MS 分辨率为 15 000,碰撞能量(collision energy):SNCE 20/30/40,喷雾电压(spray voltage)3.8 kV(正离子模式)、-3.4 kV(负离子模式)。

**2.7.4 差异代谢物与代谢通路分析** 原始质谱数据经 ProteoWizard 软件转化成“.mzXML”格式,并对每个色谱图进行峰识别、峰提取、峰对齐等处理,通过二级质谱数据库匹配进行物质注释,对所得到的数据进行偏离值过滤、缺失值过滤、缺失值填补、数据标准化等处理。将清洗后的数据进行归一化处理,使用 SIMCA v16.0.2 对数据进行对数转换以及中心化格式化处理,进行自动建模分析。将筛选编辑后的结果根据投影(VIP)值和 Student t 检验筛选潜在代谢物,通过在线数据库 HMDB(<http://www.Hmdb.ca/>)、京都基因与基因组百科全书数据库(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)和 Metabo Analyst(<http://www.metaboanalyst.ca/faces/upload-view.xhtml>)等检索差异性代谢物和代谢通路,并且寻找最相关通路上的关键靶点。

## 2.8 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件以及 GraphPad Prism 9.5.0 进行数据分析以及图像处理。多组间数据比较采用 One-way ANOVA,组间两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$  表明差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠体质量及肝脏指数的影响

与空白组相比,模型组大鼠与青钱柳组大鼠体

质量均显著升高( $P<0.001$ ),且青钱柳组显著低于模型组大鼠体质量( $P<0.001$ )。与模型组相比,青钱柳组大鼠肝脏指数均显著降低( $P<0.01$ , $P<0.001$ ),且与空白组大鼠肝脏指数无明显统计差异。详见图 1。

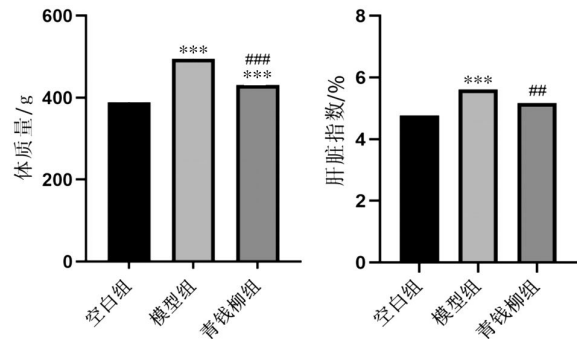


图1 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠体质量及肝脏指数的影响( $\bar{x}\pm s$ , $n=6$ )

**Fig.1** Effects of *Cyclocarya paliurus* on body mass and liver index in diabetic rats with fatty liver disease ( $\bar{x}\pm s$ , $n=6$ )  
注:与空白组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ 。

### 3.2 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠血生化指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠 FBS、TG、TC、ALT、AST 含量显著升高( $P<0.001$ )。与模型组比较,青钱柳组大鼠 FBS、TG、ALT、AST 显著降低( $P<0.001$ )。详见图 2。

### 3.3 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠肝脏 MDA、SOD、GSH 水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠肝组织 MDA 水平显著升高( $P<0.001$ ),SOD、GSH 水平显著降低( $P<0.001$ );与模型组比较,青钱柳组 GSH、SOD 水平显著升高( $P<0.001$ ),MDA 水平显著下降( $P<0.01$ )。详见图 3。

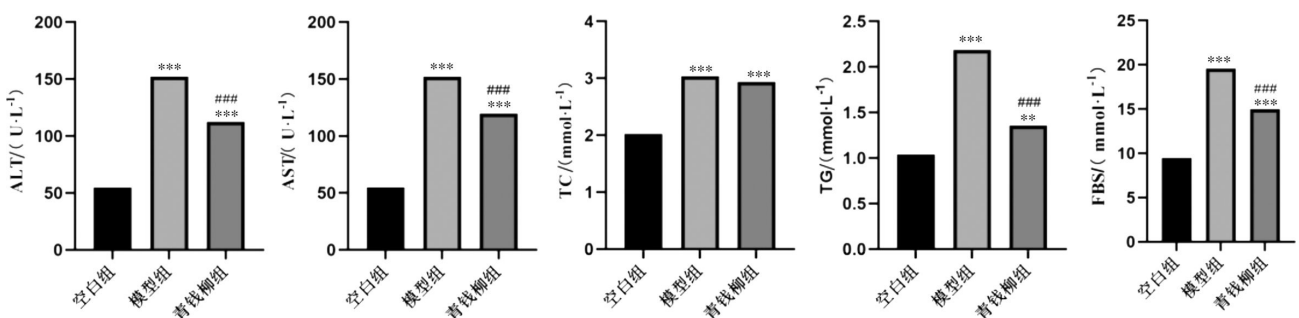


图2 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠 ALT、AST、TC、TG、FBS 水平的影响( $\bar{x}\pm s$ , $n=6$ )

**Fig.2** Effects of *Cyclocarya paliurus* on ALT, AST, TC, TG, and FBS levels in diabetic rats with fatty liver disease ( $\bar{x}\pm s$ , $n=6$ )  
注:与空白组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组相比,### $P<0.001$ 。

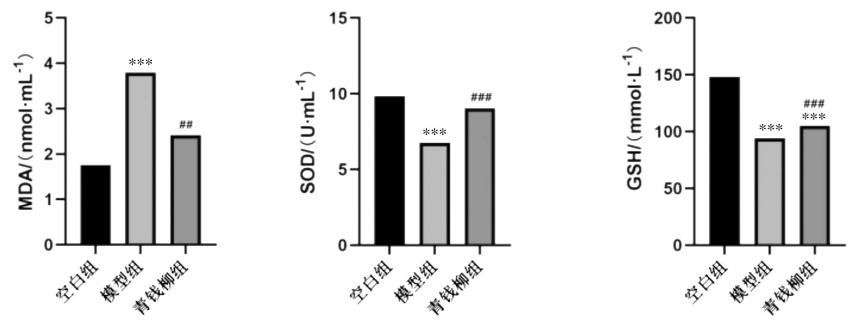


图 3 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠肝脏 MDA、SOD、GSH 水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

**Fig.3** Effects of *Cyclocarya paliurus* on hepatic MDA, SOD, and GSH levels in diabetic rats with fatty liver disease ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

注:与空白组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ 。

### 3.4 青钱柳对糖尿病性脂肪肝大鼠肝组织病理学的影响

HE 染色显示:空白组大鼠肝脏组织结构正常清晰、细胞形态排列整齐,空泡状改变较少,无明显炎性细胞浸润;模型组大鼠肝脏组织结构异常、细胞形态结构紊乱、出现大量脂滴空泡及炎性浸润;青钱柳组大鼠有脂肪肝的组织病理学特征,但相比模型组有很大缓解。肝组织油红 O 染色显示,空白组未见红色脂滴;模型组肝细胞内出现大量红色脂滴,脂滴较大,脂质含量显著增高;青钱柳组的肝细胞内脂滴形成明显减少,脂质含量显著降低。PAS 染色结果显示:空白组大鼠肝脏糖原染成大片

的紫红色;与空白组相比,模型组大鼠肝糖原染色面积显著减少并且颜色明显偏淡;与模型组相比,青钱柳组染色明显改善。详见图 4。

### 3.5 代谢组学分析

3.5.1 大鼠肝组织代谢物主成分分析 主成分分析(principal component analysis, PCA)图显示 3 个 QC 样本紧密聚集在一起(图5A),并且在 PCA-X 一维分布图中呈现的 QC 样本全部在 $\pm 2$  STD 之内(图5B),以上结果表明本实验方法稳定性好数据质量较高,适合继续研究。

3.5.2 大鼠肝组织 OPLS-DA 分析 采用 OPLS-DA 回归对代谢物表达与样品之间的关系进行建模,进

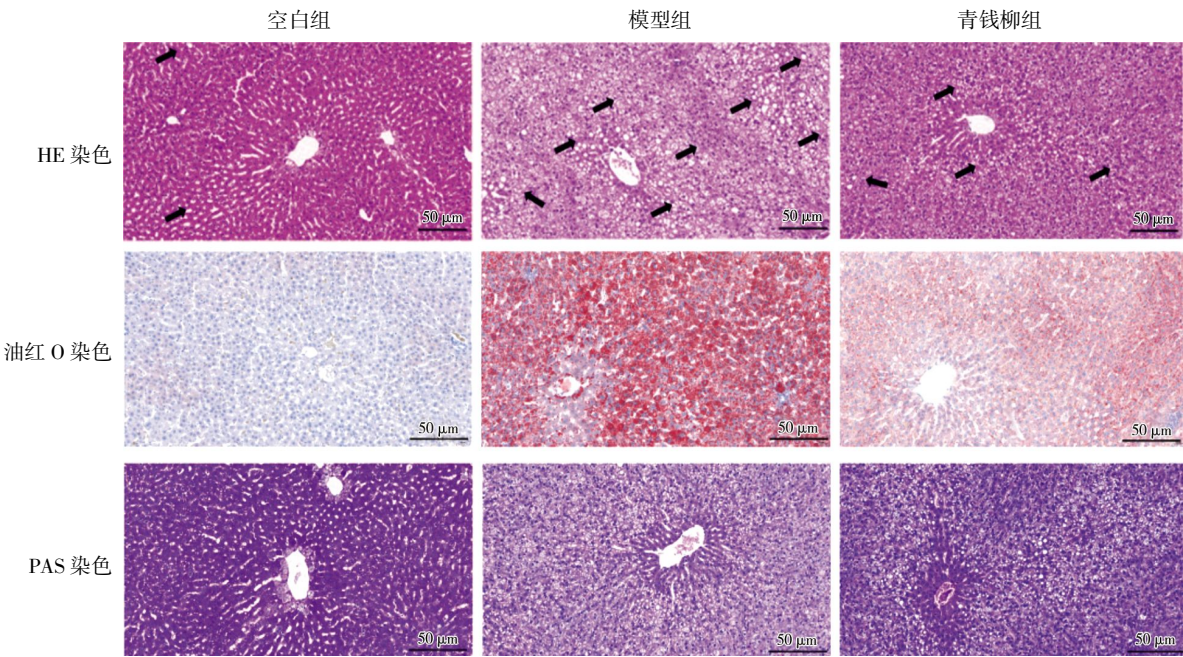


图 4 各组大鼠肝脏形态学比较

**Fig.4** Comparison of liver morphology among groups of rats

注:黑色箭头所指为脂肪空泡。



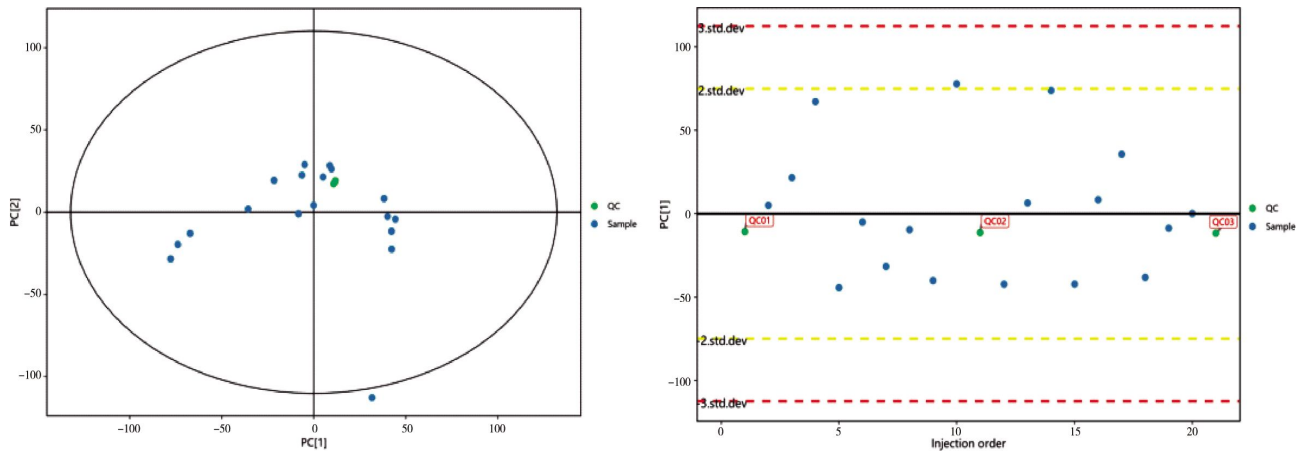


图 5 质量控制分析

Fig.5 Quality control analysis

一步构建并区分组间差异代谢物。OPLS-DA 结果表明,空白组和模型组( $R^2Y=0.991$ ,  $Q^2=0.871$ )、模型组与青钱柳组( $R^2Y=0.971$ ,  $Q^2=0.582$ )有较好的区别,模型稳定可靠,代谢物差异明显,表明组间差异远远大于组内差异(图 6)。

**3.5.3 大鼠肝组织差异代谢物分析** 3 组共得到检测物质 13 894 个,空白组与模型组差异代谢物 4 385 个(上调 2 059 个,下调 2 326 个),模型组与青钱柳组差异代谢物 2 903 个(上调 2 583 个,下调 320 个)。将获得的所有代谢物绘制火山图,图中横坐标代表该组对比各物质的倍数变化(取以 2 为底的对数),纵坐标表示学生  $t$  检验的  $P$ -value(取以 10 为底对数的负数),散点大小代表 OPLS-DA 模型的 VIP 值,散点越大 VIP 值越大。显著上调的代谢物以红色表示,显著下调的代谢物以蓝色表示,非显著差异的代谢物为灰色(图 7)。

**3.5.4 回调差异代谢物** 以  $VIP>1.5$  且  $P<0.05$  作为差异代谢物筛选标准,空白组与模型组差异代谢物 80 个,模型组与青钱柳组差异代谢物 81 个,将空白组与模型组、青钱柳组与模型组的差异代谢物取交集共获得 8 个内源性代谢物,将其相对含量进行  $z$ -score 标准化,观察这 8 个差异代谢物在不同分组中的相对含量变化趋势(表 1)。

**3.5.5 差异代谢通路和相关靶点分析** 将筛选出的 8 个生物标志物导入 MetaboAnalyst 网站进行代谢通路分析,发现涉及相关通路 9 条(表 2)。根据  $P<0.05$  且  $Impact>0.1$  筛选出主要的回调代谢通路,推测青钱柳主要通过调节丁酸代谢(butanoate metabolism)对糖尿病性脂肪肝起到治疗作用,可能通过影响差异代谢物乙酰乙酸(acetoacetic acid)调节丁酸代谢,最终改善酮体及短链脂质生成。

结合 HMDB 数据库对丁酸代谢通路进行分析,发现单羧酸转运蛋白 1(monocarboxylate transporter

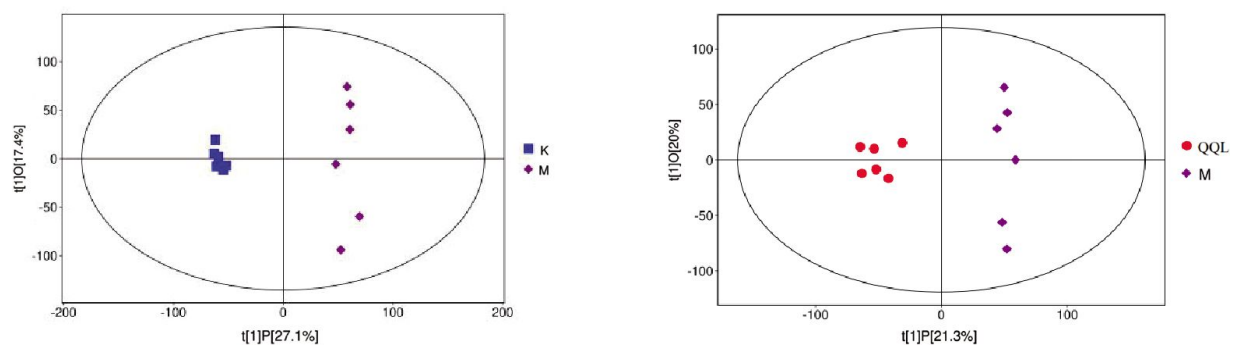


图 6 各组大鼠肝脏组织代谢物正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)得分图

Fig.6 Score plot of Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) for liver tissue metabolites in three groups of rats

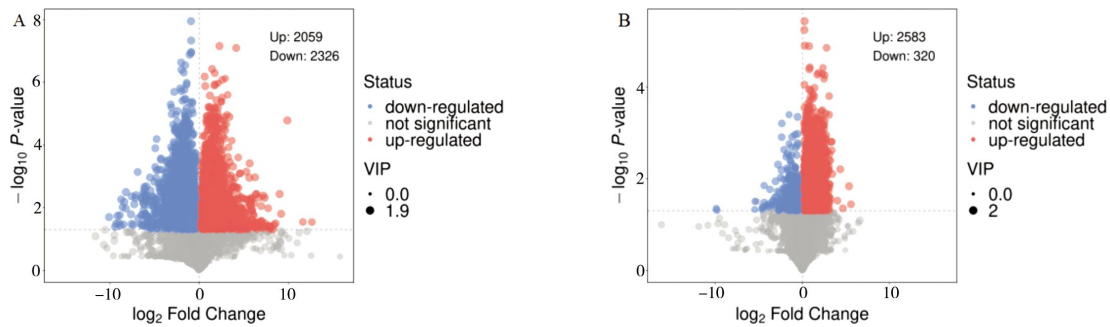


图 7 差异代谢物筛选火山图

**Fig.7** Volcano plot for screening differential metabolites

注 A.空白组 vs 模型组;B.青钱柳组 vs 模型组。

表 1 回调差异代谢物

**Table 1** Reversion of differential metabolites

| 代谢物                              | 分子式                                                           | 质荷比       | 保留时间/min | 模型组 vs 空白组 |      |      |    | 青钱柳组 vs 模型组 |      |      |    |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|----------|------------|------|------|----|-------------|------|------|----|
|                                  |                                                               |           |          | VIP        | P 值  | FC   | 变化 | VIP         | P 值  | FC   | 变化 |
| 磷酸(Phosphoric acid)              | H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P                               | 98.984 2  | 4.144 3  | 1.80       | 0.00 | 0.60 | ↓  | 1.54        | 0.04 | 1.42 | ↑  |
| 肌苷(Inosine)                      | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | 269.087 6 | 2.024 7  | 1.64       | 0.00 | 0.75 | ↓  | 1.73        | 0.00 | 1.27 | ↑  |
| 甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate)    | C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P                | 173.021 0 | 4.143 8  | 1.77       | 0.00 | 0.61 | ↓  | 1.53        | 0.04 | 1.42 | ↑  |
| D-葡萄糖-6 磷酸(Glucose-6 phosphate)  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P               | 261.037 1 | 4.505 7  | 1.72       | 0.00 | 0.23 | ↓  | 1.53        | 0.01 | 1.77 | ↑  |
| 乙酰乙酸(Acetoacetic acid)           | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | 85.028 4  | 4.289 7  | 1.59       | 0.00 | 0.24 | ↓  | 1.61        | 0.01 | 3.07 | ↑  |
| 邻氨基苯甲酸甲酯(Methyl 2-aminobenzoate) | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | 152.070 7 | 3.482 7  | 1.71       | 0.02 | 0.20 | ↓  | 1.82        | 0.00 | 1.87 | ↑  |
| 3'-唾液乳糖钠盐(3'-Sialyllactose)      | C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>18</sub>              | 656.199 9 | 4.053 8  | 1.57       | 0.01 | 0.14 | ↓  | 1.66        | 0.04 | 5.38 | ↑  |
| D-fagomine, 莽麦碱(Fagomine)        | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>                | 148.096 5 | 3.482 7  | 1.56       | 0.00 | 0.28 | ↓  | 1.52        | 0.01 | 1.83 | ↑  |

表 2 回调差异代谢通路

**Table 2** Reversion of differential metabolic pathways

| 代谢通路                                                                | Hits | P    | Holm p | Impact |
|---------------------------------------------------------------------|------|------|--------|--------|
| 新霉素、卡那霉素和庆大霉素的生物合成(Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis) | 1    | 0.01 | 0.41   | 0      |
| 丁酸代谢(Butanoate metabolism)                                          | 1    | 0.04 | 1      | 0.11   |
| 甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)                                      | 1    | 0.04 | 1      | 0.04   |
| 淀粉与蔗糖的代谢(Starch and sucrose metabolism)                             | 1    | 0.05 | 1      | 0.14   |
| 肌醇磷酸盐代谢(Inositol phosphate metabolism)                              | 1    | 0.07 | 1      | 0      |
| 甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)                              | 1    | 0.09 | 1      | 0.08   |
| 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(Valine, leucine and isoleucine degradation)          | 1    | 0.10 | 1      | 0      |
| 酪氨酸代谢(Tyrosine metabolism)                                          | 1    | 0.10 | 1      | 0      |
| 嘌呤代谢(Purine metabolism)                                             | 1    | 0.17 | 1      | 0.00   |

注: Hits—差异代谢物命中该通路的个数;P—代谢通路富集分析的 P 值;Holm p—用霍尔姆法校正的 P 值;Impact—代谢通路拓扑分析的影响值。

1,SLC16A1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、过氧化酶增殖因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor gamma,PPARG)、组蛋白脱乙酰酶 4(histone deacetylase 4,HDAC4)、组蛋白脱乙酰酶 9(histone deacetylase 9,HDAC9)等靶点与丁酸代谢相关。课题组前期通过网络药理学预测了青钱柳治疗 T2DM 合并 NAFLD 的核心作用靶点<sup>[11]</sup>,与本次差异代谢通路的相关靶点取交集,推测青钱

柳主要通过 PPARG 与 TNF 靶点调控丁酸代谢改善 T2DM 合并 NAFLD。

#### 4 讨论

NAFLD 包括一系列的肝损伤,被视为代谢综合征的肝脏表现,与遗传及多种代谢风险因素相关<sup>[12]</sup>,已成为肝脏相关发病和死亡的主要原因,目前的全球患病率约为 25%,并预计将持续增加<sup>[13]</sup>。天然产物在新药开发和设计中发挥重要作用,在各种疾病的治疗中显示出巨大潜力,黄连素和西利马林被发现可以改善患者肝脏脂质积累,目前,处于第四阶段临床研究,有望成为治疗 NAFLD 的特效药物<sup>[14-15]</sup>。

青钱柳是我国特有的药食同源植物,以其树叶为原料研制的保健茶,已经获得了 FDA 的认可,并且被国家卫生和计划生育委员会 2013 年第 4 号公告列入新食品原料,具有广阔的研究前景。目前,已有大量研究表明青钱柳具有降血糖、降血脂、降尿酸、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化应激、调节肠道菌群等功效,但具体机制尚未阐明。代谢组学可直接反映生物体的生理及病理变化,具有动态性和整体性等特点<sup>[16]</sup>。本研究通过对比空白组、模型组与青钱柳组大鼠的肝脏代谢组学、肝病理组织染色以及血生化检测指标,综合探讨青钱柳治疗糖尿病性脂肪肝的作用机制。

在本实验中,高糖高脂饲料喂养结合腹腔注射 STZ 诱导 T2DM 合并 NAFLD 模型,造模成功的大鼠体重、肝重指数明显增加,与模型组大鼠相比,青钱柳组 FBS、ALT、AST、TG 血生化指标显著降低,肝脏氧化应激指标 GSH、SOD 水平显著升高,MDA 水平显著下降。肝组织 HE、油红 O、PAS 染色结果表明,青钱柳可显著缓解肝细胞弥漫性肿胀,减少肝脏脂滴沉积,改善肝糖原生成。以上实验结果表明,青钱柳对 T2DM 合并 NAFLD 大鼠血糖、血脂有调节作用,可以减轻肝损伤、改善肝组织脂质沉积,恢复其抗氧化能力。

通过肝脏代谢组学进一步研究发现,青钱柳治疗 T2DM 合并 NAFLD 主要与调节丁酸代谢相关。人体中大部分丁酸是由肠道微生物群在大肠中发酵产生,约占短链脂肪酸(short-chain fatty acid,SC-

FA)总产量的 20%,被认为是调节肠道菌群在全身能量平衡中的重要媒介<sup>[17]</sup>,在肠外分布于中枢系统及周围组织,如肝脏、棕色脂肪组织以及白色脂肪组织。丁酸在脂肪酸氧化过程中代谢为 CO<sub>2</sub>、乙酰基 CoA,后者可以进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TCA cycle)用于脂质和葡萄糖的合成。DEN 等<sup>[18]</sup>研究表明,丁酸在肝脏中的作用与过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ,PPAR  $\gamma$ )有关,通过降低 PPAR  $\gamma$ ,丁酸增加了解偶联蛋白 2(uncoupling protein 2,UCP2)表达和线粒体质子泄漏,改变 AMP/ATP 比率并通过腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)通路以减少脂质合成、增加脂质氧化。目前,丁酸及其衍生物苯丙氨酸丁酰胺(C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,FBA)已被证明对改善胰岛素抵抗和脂肪肝有保护作用,通过激活 AMPK/乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase,ACC)途径,减少肝脏 ROS 的产生,调节线粒体功能,被视为一种新的治疗策略<sup>[19]</sup>。

此外,本研究中 TG 水平下降,差异代谢物甘油磷酸酯(Glycerol-3-phosphate,G3P)水平升高,提示用药后可能通过促进 TG 分解、抑制 G3P 途径介导的甘油三酯合成,最终导致 TG 水平下降;肝内生成的葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase,G6P)与糖酵解、磷酸戊糖途径、糖原合成等多个代谢途径相关,是糖代谢的枢纽,也是代谢重编程的主要原因<sup>[20]</sup>,推测青钱柳通过调节 G6P 参与肝糖代谢过程;D-Fagomine 是 1-脱氧野尻霉素的类似物,已被证明具有降血糖活性,能够抑制  $\alpha$ -糖苷酶活性<sup>[21]</sup>,实验研究表明,D-Fagomine 可能通过改变肠道微生物群减轻炎症水平及葡萄糖耐受性受损<sup>[22]</sup>,此外还可以通过调控 AMPK/沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1,SIRT1)/过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活子 1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$ ,PGC-1 $\alpha$ )通路减轻高葡萄糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激<sup>[23]</sup>。

综上所述,本研究在代谢层面探讨了青钱柳治疗 T2DM 合并 NAFLD 的作用,提示其可以通过调节丁酸代谢改善糖脂代谢紊乱,可能与肠道微生物



群相关,课题组接下来将进一步从“肠-肝”轴角度探讨青钱柳治疗 T2DM 合并 NAFLD 的作用机制。

## 参考文献

- [1] MARUŠIĆ M, PAIĆ M, KNOBLOCH M, et al. NAFLD, insulin resistance, and diabetes mellitus type 2[J]. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 2021(1): 6613827.
- [2] MANTOVANI A, BYRNE C D, BONORA E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: A meta-analysis[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(2): 372-382.
- [3] TARGHER G, COREY K E, BYRNE C D, et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus—Mechanisms and treatments[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18: 599-612.
- [4] HARRISON S A, BEDOSSA P, GUY C D, et al. A phase 3, randomized, controlled trial of resmetirom in NASH with liver fibrosis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2024, 390(6): 497-509.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 18-19.
- [6] 黄璐琦, 李天祥. 中国中药资源大典: 天津卷[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2020: 183-185.
- [7] FENG Z L, FANG Z J, CHEN C, et al. Anti-hyperglycemic effects of refined fractions from *Cyclocarya paliurus* leaves on streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6886.
- [8] 李 燕, 蔡儒安, 潘如梨, 等. 青钱柳水提取物降血糖及抗发炎功效研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 102-109.
- [9] 唐 梅, 杨胜祥, 赵立春. 青钱柳叶降血糖作用研究[J]. *井冈山大学学报(自然科学版)*, 2020, 41(5): 83-91.
- [10] XU J, LI N, WANG J, et al. Effect of metformin on the expression of SIRT1 and UCP2 in rat liver of type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2013, 38(9): 882-887.
- [11] 刘艺璇, 吴 琴, 张亚男, 等. 基于网络药理学与实验验证探讨青钱柳治疗糖尿病性脂肪肝作用及机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(11): 52-60.
- [12] LOOMBA R, FRIEDMAN S L, SHULMAN G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2537-2564.
- [13] YOUNOSSI Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [14] KOPERSKA A, WESOŹEK A, MOSZAK M, et al. Berberine in non-alcoholic fatty liver disease—a review[J]. *Nutrients*, 2022, 14(17): 3459.
- [15] MUELLER M, CASTRO R E, THORELL A, et al. Ursodeoxycholic acid: Effects on hepatic unfolded protein response, apoptosis and oxidative stress in morbidly obese patients[J]. *Liver International*, 2018, 38(3): 523-531.
- [16] CHACKO S, HASEEB Y B, HASEEB S. Metabolomics work flow and analytics in systems biology[J]. *Current Molecular Medicine*, 2022, 22(10): 870-881.
- [17] LOUIS P, FLINT H J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(1): 29-41.
- [18] DEN BESTEN G, BLEEKER A, GERDING A, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation[J]. *Diabetes*, 2015, 64(7): 2398-2408.
- [19] MOLLIKA M P, MATTACE RASO G, CAVALIERE G, et al. Butyrate regulates liver mitochondrial function, efficiency, and dynamics in insulin-resistant obese mice[J]. *Diabetes*, 2017, 66(5): 1405-1418.
- [20] RAJAS F, GAUTIER-STEIN A, MITHIEUX G. Glucose-6 phosphate, A central hub for liver carbohydrate metabolism[J]. *Metabolites*, 2019, 9(12): 282.
- [21] KUMARI S, SAINI R, BHATNAGAR A, et al. Exploring plant-based  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Promising contenders for combatting type-2 diabetes[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2023: 1-16.
- [22] MOLINAR-TORIBIO E, PÉREZ-JIMÉNEZ J, RAMOS-ROMERO S, et al. D-Fagomine attenuates metabolic alterations induced by a high-energy-dense diet in rats[J]. *Food & Function*, 2015, 6(8): 2614-2619.
- [23] RAMOS-ROMERO S, HEREU M, ATIENZA L, et al. The buck wheat iminosugar d-fagomine attenuates sucrose-induced steatosis and hypertension in rats[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(1): e1900564.

(本文编辑 苏 维)