

中药现代化技术

# 代谢组学探究刺梨提取物对高尿酸血症大鼠的作用

刘 含<sup>1</sup>, 庄乾飞<sup>1</sup>, 郭银萍<sup>1</sup>, 穆兴燕<sup>1</sup>, 石自慧<sup>1</sup>, 刘晓燕<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵阳学院 食品与制药工程学院, 贵州 贵阳 550005; 2. 贵州省果品加工工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550005)

**摘要:** 采用氧嗉酸钾建立高尿酸血症大鼠模型, 分别以别嘌醇(阳性药物对照)、低、中、高剂量刺梨提取物对大鼠进行给药, 使用 LC-MS 技术对大鼠血清进行非靶向定性解析, 运用多元统计方法进行大鼠血清数据分析并筛选出差异代谢物, 通过 MBRole 2.0 通路分析功能进行代谢途径分析。结果显示, 不同剂量的刺梨提取物均能降低高尿酸血症大鼠的血清尿酸浓度, 并在血清中鉴定出 242 种代谢物。在变量重要性投影(VIP)>1、 $P<0.01$  以及差异倍数(FC)≥2 的标准下, 共筛选出 44 种显著差异代谢物, 与差异代谢物相关的代谢途径共有 58 条。刺梨提取物降低尿酸可能与其对黄嘌呤氧化酶活性的抑制以及对血清脂质和氨基酸代谢的调节有关。

**关键词:** 刺梨提取物; 高尿酸血症; 非靶向代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路; 中药现代化技术

中图分类号: R589.7; TS255.1; R285.5 文献标识码: A

文章编号: 1003-5214(2024)02-0381-10 开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Effect of *Rosa roxburghii* Tratt. extract on hyperuricemia rats by metabonomics

LIU Han<sup>1</sup>, ZHUANG Qianfei<sup>1</sup>, GUO Yiping<sup>1</sup>, MU Xingyan<sup>1</sup>, SHI Zihui<sup>1</sup>, LIU Xiaoyan<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, Guizhou, China; 2. Guizhou Fruit Processing Engineering Technology Research Center, Guiyang 550005, Guizhou, China)

**Abstract:** Hyperuricemia rat models, established with potassium oxonate, were administered with low, medium and high doses of *Rosa roxburghii* Tratt. extract as well as allopurinol (positive drug control). Non-targeted qualitative analysis on rat serum was performed using LC-MS technology, with multivariate statistical methods used to analyze rat serum data and screen for differential metabolites. Metabolic pathway analysis was further conducted via the MBRole 2.0 pathway analysis function. The results showed that all dosage of *Rosa roxburghii* Tratt. extract could reduce uric acid concentration in serum of hyperuricemia rats, and 242 metabolites were identified in the serum. Under the criteria of variable importance projection (VIP)>1,  $P<0.01$ , and fold change (FC)≥2, a total of 44 significantly different metabolites were screened, with a total of 58 metabolic pathways corresponding to different metabolites. The reduction of uric acid by *Rosa roxburghii* Tratt. extract might be related to its inhibition of xanthine oxidase activity and regulation of serum lipid and amino acid metabolism.

**Key words:** *Rosa roxburghii* Tratt. extract; hyperuricemia; nontargeted metabolomics; differential metabolites; metabolic pathway; modern technology of Chinese medicine

由于不健康的生活方式和饮食习惯, 高尿酸血症的发生率逐渐增加, 尤其在年轻的男性中呈快速上升趋势<sup>[1]</sup>。目前, 高尿酸血症的病因和发病机制尚未完全阐明, 还未找到根治的方法, 抗尿酸药品也只能阶段性地降低尿酸并缓解痛风的症状。

长期以来, 尿酸类药物和黄嘌呤氧化酶抑制剂已用于治疗高尿酸血症和痛风, 如别嘌醇和苯溴马酮等。然而, 这些药物可能引起一系列不良反应<sup>[2]</sup>。因此, 随着人们对健康的重视, 研发绿色、安全的新型天然中成药降尿酸成为一种迫切需求。CHEN

收稿日期: 2023-04-07; 定用日期: 2023-06-21; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230282

作者简介: 刘 含(1997—), 男, 硕士生, E-mail: 1653314001@qq.com。联系人: 刘晓燕(1972—), 女, 教授, E-mail: 1195296111@qq.com。

等<sup>[3]</sup>研究证明,许多中草药和提取物对高尿酸血症和痛风的治疗有效。刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt. RRT)主要分布在中国云贵高原地区,其主要活性成分为多糖、多酚<sup>[4]</sup>,质量分数分别在 39%<sup>[5]</sup>和 10%左右<sup>[6]</sup>。刺梨多酚与多糖均是一类小分子的总称,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性。文献[7-11]的研究结果表明,多酚可以抑制黄嘌呤氧化酶(XOD)的活性,减少尿酸的再吸收,改善尿酸分泌,从而达到降尿酸的目的。而多糖则可下调尿酸和 XOD 的水平,缓解痛风性关节炎导致的踝关节肿胀。上述研究只是利用传统方法考察活性物质对高尿酸血症的作用,缺乏多种活性物质对高尿酸血症共同作用结果的整体性研究。而药物对高尿酸血症的治疗是通过多组分、多通路、多靶点机制发挥整体调控,达到治疗作用。代谢组学研究方法能在疾病的一个特定阶段揭示内源性小分子物质(糖类、有机酸、脂类、氨基酸等)的整体动态变化,从而在全局上揭示不同人类疾病可能的发展机制<sup>[12]</sup>。

本研究拟采用氧嗪酸钾建立高尿酸血症大鼠模型,运用液相-质谱联用技术结合多变量统计分析,考察大鼠血清的代谢物,筛选血清差异代谢物,分析受影响的代谢途径,初步探究刺梨提取物对高尿酸血症大鼠的影响。以期对刺梨在预防或治疗高尿酸血症方面提供理论支持。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

刺梨,贵州省龙里县;甲醇(分析纯)、甲酸(色谱纯)、乙腈(色谱纯),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;2-氯-L-苯丙氨酸、别嘌呤、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、氧嗪酸钾,分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;水合氯醛(质量分数 10%),福州飞净生物科技有限公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

Vanquish 液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 质谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  (2.1 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱,美国 Waters 公司;SCIENTZ-18N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 提取物制备

称取 200 g 刺梨冻干粉(鲜果去籽切片,在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冻干 36 h 后打粉,过 60 目筛)按料液比 1:20 (g:mL)与体积分数 70%的乙醇溶液混合,50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。50  $^{\circ}\text{C}$ 、功率 400 W 超声 30 min。过滤,收集滤渣,重复提取 3 次合并滤液。蒸发浓缩后用

体积分数为 70%的乙醇水溶液在 25 mL 容量瓶中定容, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冻干 36 h 后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

#### 1.2.2 高尿酸血症大鼠造模及给药

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体重 180~200 g,长沙市天勤生物技术有限公司,饲养于贵州医科大学动物实验中心。动物实验依照国家健康委员会出版的《实验动物护理和使用指南》中的规定执行,许可证号:SCXK(湘)2022-0011。

大鼠随机分为 6 组,每组 8 只。分别为对照组、模型组、别嘌呤组、刺梨提取物低剂量组、刺梨提取物中剂量组和刺梨提取物高剂量组,实验期间所有大鼠正常饮食。

对照组大鼠灌胃等容积的溶媒(质量分数 0.4%的 CMC-Na 水溶液),除去对照组的其余大鼠每天灌胃剂量 2 g/kg 的氧嗪酸钾溶液(质量分数为 0.4%的 CMC-Na 水溶液溶解),连续灌胃 7 d 后,测定血清尿酸含量。将血清尿酸高于 110  $\mu\text{mol/L}$  的大鼠再随机分为模型组、别嘌呤组、刺梨提取物低、中、高剂量组。对照组、模型组大鼠灌胃等体积的溶媒(质量分数 0.4%的 CMC-Na 水溶液),别嘌呤组大鼠每天灌胃剂量 25 mg/kg 的别嘌呤溶液(用质量分数 0.4%的 CMC-Na 水溶液溶解),刺梨提取物低、中、高剂量组大鼠每天灌胃剂量 0.5、1.0、2.0 g/kg 提取物,连续灌胃 14 d。

#### 1.2.3 样品采集和血清尿酸测定

连续灌胃 7 d 后,眼眶后静脉丛取血 0.5 mL,4  $^{\circ}\text{C}$ 静置,凝血后 3000 r/min 离心 15 min,测定血清尿酸含量。

14 d 最后一次治疗后 1 h 同样采取眼眶后静脉丛取血 0.5 mL 的方法,进行相同的处理并测定血清尿酸含量。

在第 14 d 采集全血。大鼠用质量分数 10%水合氯醛溶液麻醉处死后采集血液,3000 r/min 离心 15 min,获得血清。血浆在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,直到检测。

#### 1.2.4 血清样本前处理

参照徐雅琴等<sup>[13]</sup>的方法,稍作修改。在 4  $^{\circ}\text{C}$ 进行以下操作:解冻血清,混匀后加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇于适量样本中;混匀离心(1.2 $\times$ 10<sup>4</sup> r/min, 10 min),取上清液,50  $^{\circ}\text{C}$ 浓缩干燥;加入质量浓度 4 mg/L 的 2-氯-L-苯丙氨酸溶液(150  $\mu\text{L}$  体积分数为 80%甲醇水溶液配制)复溶,0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤,待测。

#### 1.2.5 液相色谱-质谱(LC-MS)测试

液相色谱条件:Thermo Vanquish,色谱柱 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 (2.1 mm $\times$ 150 mm $\times$ 1.8  $\mu\text{m}$ ),流速 0.25 mL/min,柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件:参照李娇珍等<sup>[14]</sup>和马雅洁<sup>[15]</sup>的方法,稍作修改。Thermo Orbitrap Exploris 120 质谱检

测器, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 -2.50 kV, 鞘气 206.8 kPa, 辅助气 68.9 kPa。毛细管温度 325 °C, 以分辨率  $6.0 \times 10^4$  进行一级全扫描, 一级离子扫描范围  $m/z$  在 100~1000 之间, 并采用高能诱导裂解技术 (HCD) 进行二级裂解, 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为  $1.5 \times 10^4$ 。

表 1 为色谱梯度洗脱程序。

表 1 色谱梯度洗脱程序  
Table 1 Chromatographic gradient elution procedure

时间/min	体积分数/%	
	流动相 A	流动相 B
0~1	98	2
1~9	98~50	2~50
9~12	50~2	50~98
12~13.5	2	98
13.5~14	2~98	98~2
14~20	98	2

注: A—体积分数 0.1% 的甲酸水溶液; B—体积分数 0.1% 的甲酸乙腈溶液。

### 1.2.6 非靶向血清数据处理

采用 Excel、Proteowizard、R 语言、SIMCA 14.1 及其 omics\_skin 组件、Origin 2022、KEGG (<http://www.kegg.com/>)、MBRole 2.0 通路分析平台处理数据并制图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LC-MS 检测结果

按 1.2.5 节实验方法及 1.2.6 节数据处理得到 242 种代谢物, 并对其进行分类, 结果见图 1。

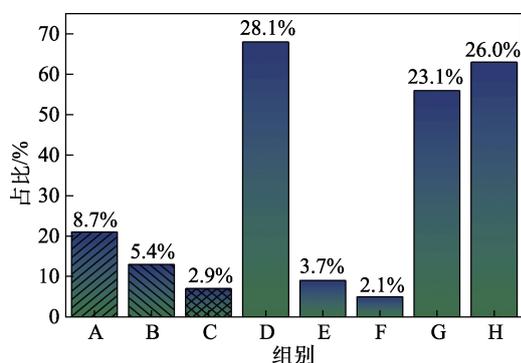


图 1 242 种代谢物分类

Fig. 1 Classification of 242 metabolites

由图 1 可知, 正离子模式获得 21939 个前体分子, 负离子模式获得 15533 个前体分子。在二级质谱信息中, 对照组、模型组、别嘌呤组、刺梨提取物低、中、高剂量组共检测到 242 种代谢物。其中,

脂肪酸及其结合物 (H)、氨基酸及其衍生物 (G)、碳水化合物及其结合物 (A)、嘌呤及其衍生物 (B)、类固醇及其衍生物 (E)、嘧啶及其衍生物 (C)、吡啶类及其衍生物 (F) 是鉴定出最多的 7 类物质, 占 242 种代谢物的 71.9%, 其他 (D) 为 28.1%。

### 2.2 造模结果

按 1.2.3 节的实验方法, 测定了刺梨提取物对高尿酸血症大鼠血清尿酸的影响, 结果如图 2 所示。

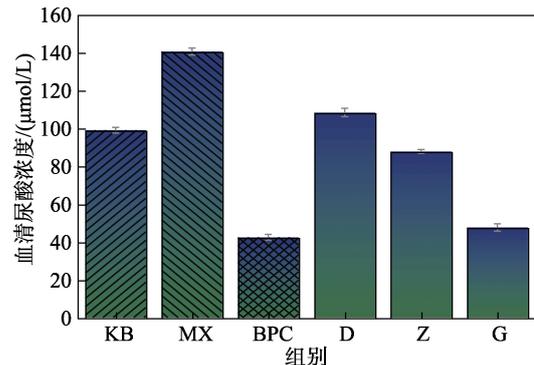


图 2 刺梨提取物对高尿酸血症大鼠血清尿酸的影响

Fig. 2 Effect of *Rosa roxburghii* Tratt. extract on serum uric acid in rats with hyperuricemia

由图 2 可知, 使用氧嗪酸钾成功地建立了大鼠高尿酸血症模型。与空白对照组 (KB 组) 相比, 模型组 (MX 组) 的血清尿酸水平明显升高, 证明了模型的有效性。与 MX 组相比, 刺梨提取物低剂量组 (D 组)、中剂量组 (Z 组)、高剂量组 (G 组) 都能降低血清尿酸浓度, 表明刺梨提取物对高尿酸血症有一定的治疗效果。D 和 Z 组血清尿酸浓度与 KB 组相近, 并没有达到显著降低的效果。用 25 mg/kg 别嘌呤处理的大鼠 (BPC 组) 血清尿酸浓度显著降低, 远远低于 D、Z 组处理的大鼠, 刺梨提取物 G 组降尿酸效果接近于 BPC 组。

### 2.3 大鼠血清稳定性考察

按 1.2.5 节实验方法及 1.2.6 节数据处理得到 6 组大鼠血清的正负离子模式下的总离子流色谱图, 结果见图 3。

由于 LC-MS 有较高的灵敏性和较广的分析范围, 可检测出样本中含量很低的物质, 因此在非靶向血清代谢组学中常使用 LC-MS 对样品进行检测。

采用主成分分析 (PCA) 法分析 6 组数据的总体分布和整个分析过程的稳定性, 结果见图 4。

由图 4 可知, 主成分[1]的贡献率为 32.9%, 主成分[2]的贡献率为 22.7%。KB、MX、BPC、D、Z、G 组之间相互分离, 组内之间又相互靠近聚集, 只有少量数据重叠, 且范围较小。全部样本均位于 95% 置信区间内。说明组间具有差距, 整个分析方法, 包括预处理方法和仪器分析方法, 都是稳定可靠的。

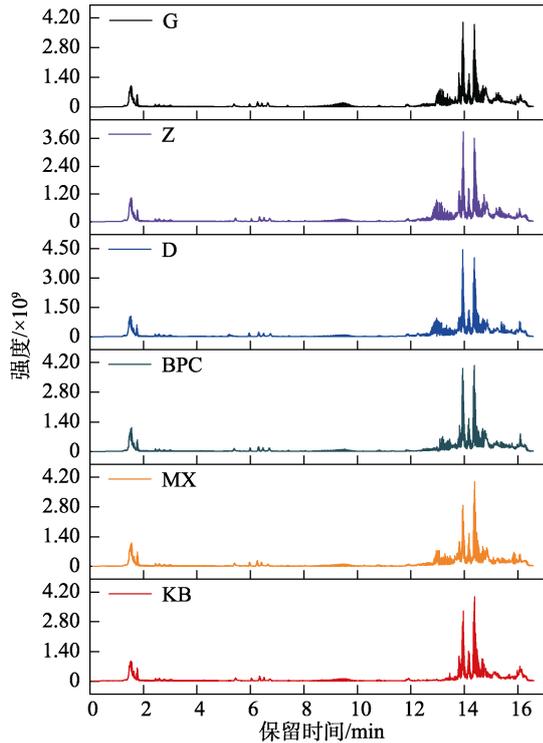


图 3 6 组血清的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatograms of six groups of serum

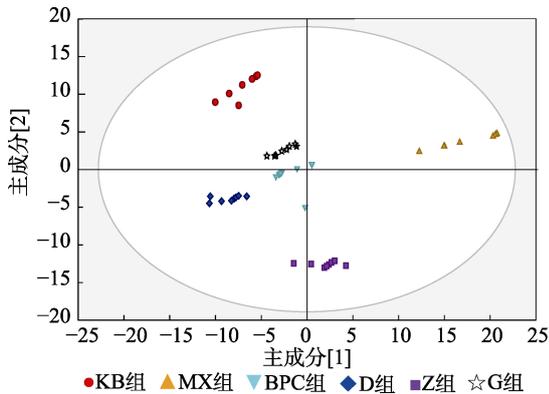


图 4 6 组数据 PCA 评分图

Fig. 4 PCA score chart for six groups of data

### 2.4 6 组代谢物差异性比较

采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型评价 KB 组和 MX 组之间的区别, 结果如图 5 所示, 具体结果见表 2。

由图 5 可知, KB 组和 MX 组明显分为两类, 表明两组之间存在显著性差异。建立的 OPLS-DA 模型的累积  $R^2Y$  和  $Q^2$  分别为 0.996 和 0.994, 说明该模型具有较高的稳定性和预测能力。由表 2 可知, 200 次排列检验验证的结果表明,  $R^2$  和  $Q^2$  分别为 0.011 和 -0.415, 均小于实际模型值。该 OPLS-DA 模型未出现过拟合, 因此具有较高的可靠性。结果表明, 高尿酸血症造模对代谢物产生了影响, MX 组和 KB 组存在差异, 这也证实了高尿酸血症大鼠模型的成功建立。

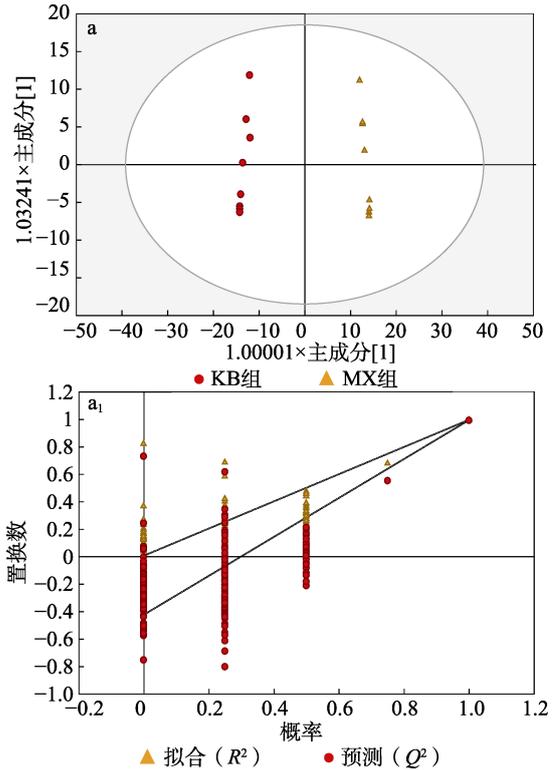


图 5 KB 组和 MX 组的 OPLS-DA 评分图 (a) 和置换检验图 (a<sub>1</sub>)

Fig. 5 OPLS-DA score chart (a) and replacement test chart (a<sub>1</sub>) of KB group and MX group

表 2 OPLS-DA 模型的主要评估指标

Table 2 Main evaluation indexes of OPLS-DA models

模型	KB 组与 MX 组	MX 组与 BPC 组	MX 组与 D 组	MX 组与 Z 组	MX 组与 G 组
$R^2Y^{(1)}$	0.996	0.996	0.993	0.998	0.978
$Q^2^{(1)}$	0.994	0.989	0.991	0.997	0.984
$R^2^{(2)}$	0.011	0.126	0.004	0.012	0.004
$Q^2^{(2)}$	-0.415	-0.405	-0.473	-0.443	-0.485

①由图 5a 得到; ②由图 5a<sub>1</sub> 得到。

图 6、7 为评价别嘌呤醇和刺梨提取物对高尿酸血症大鼠影响的结果。

由图 6、7 可知, 分别根据 OPLS-DA 模型对 BPC、D、Z 和 G 组与 MX 组进行比较, BPC、D、Z、G 组与 MX 组有明显的区别, 表明处理后的样本之间存在显著的代谢差异。OPLS-DA 模型的  $R^2Y$  和  $Q^2$  经过 200 次排列实验得出, 具体数据见表 2。  $R^2Y$  是模型对数据拟合的程度,  $Q^2$  是模型的预测能力,  $R^2Y$  和  $Q^2$  越趋近于 1, 表明模型越好。  $R^2$  较小和  $Q^2$  为负值, 回归线呈向上的趋势, 说明置换检验过关, 模型不存在过拟合现象。

### 2.5 差异代谢物的筛选与表征

表 3 为通过变量重要性投影 (VIP) > 1,  $P < 0.01$ 、差异倍数 (FC)  $\geq 2$  条件下筛选出的 44 种血清差异代谢物。

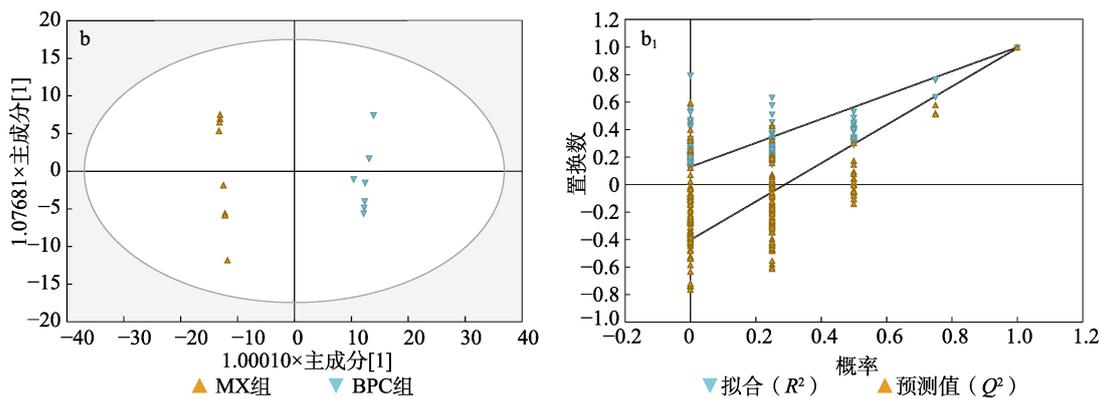


图 6 MX 组与 BPC 组的 OPLS-DA 评分图 (b) 和置换检验图 (b<sub>1</sub>)

Fig. 6 OPLS-DA score chart (b) and replacement test chart (b<sub>1</sub>) of MX group and BPC group

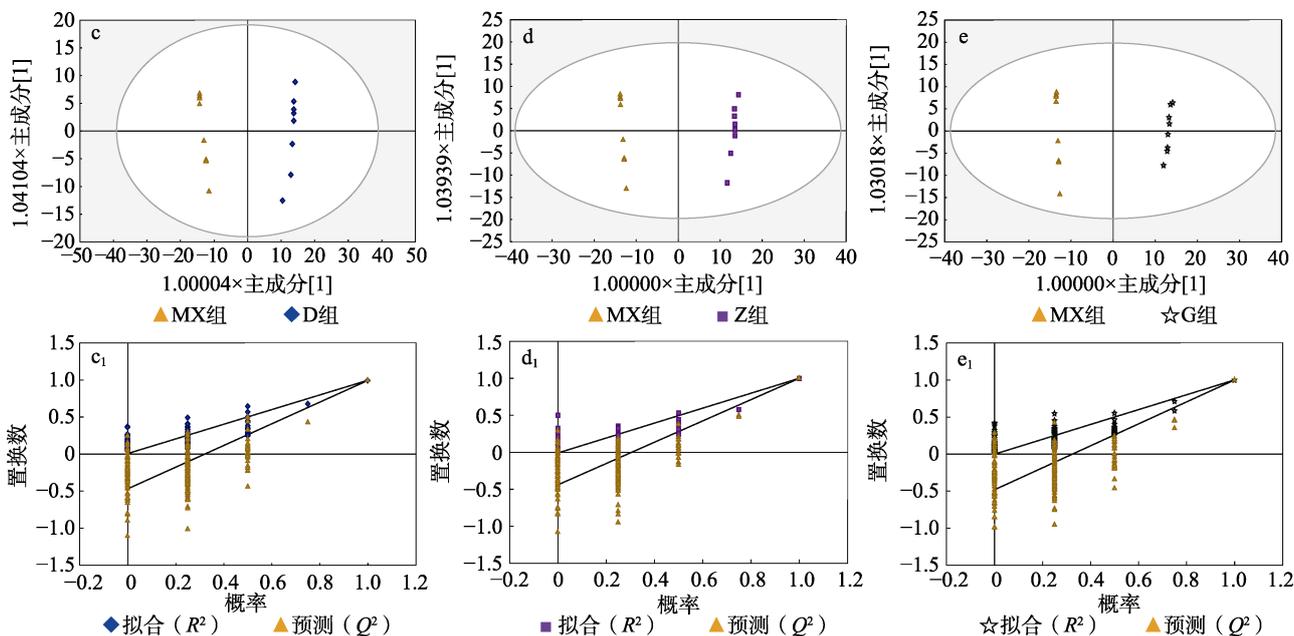


图 7 MX 组与 D、Z、G 组的 OPLS-DA 评分图 (c、d、e) 和置换检验图 (c<sub>1</sub>、d<sub>1</sub>、e<sub>1</sub>)

Fig. 7 OPLS-DA score chart (c, d, e) and replacement test chart (c<sub>1</sub>, d<sub>1</sub>, e<sub>1</sub>) of MX group and D, Z, G groups

表 3 高尿酸血症大鼠筛选出的血清差异代谢物

Table 3 Serum differential metabolites screened from hyperuricemic rats

注释编号	名称	m/Z	保留时间/s	分子式	KEGG ID
M114T101	肌酐	114.0659	100.7	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	C00791
M116T95	L-脯氨酸	116.0705	94.5	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	C00148
M158T762	壬酸	158.1529	762.1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	C01601
M145T956	3-羟甲基戊二酸	144.9810	956.0	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	C03761
M165T961	L-岩藻糖	165.1127	960.7	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	C00507
M187T399_2	L-色氨酸	187.0859	399.3	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C00078
M448T609_2	甘氨酸	448.3025	608.9	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>6</sub>	C01921
M137T97	1-甲基烟酰胺	137.0706	97.3	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	C02918
M205T442	色氨酸	205.0969	442.4	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C00806
M310T907	N,N-二甲基鞘氨醇-4-烯酸	310.3097	907.1	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	C13914
M212T73	磷酸肌酸	212.0427	73.4	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P	C02305
M139T149	尿刊酸	139.0501	148.5	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C00785
M284T883	硬脂酸酰胺	284.2948	883.0	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	C13846
M357T730	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-二十二碳六烯酸乙酯	357.2795	730.5	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C16185
M184T80	磷酸胆碱	184.0713	80.0	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> P	C00588
M188T377	(3S)-6-乙酰氨基-3-氨基己酸酯	188.1279	377.4	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C21604

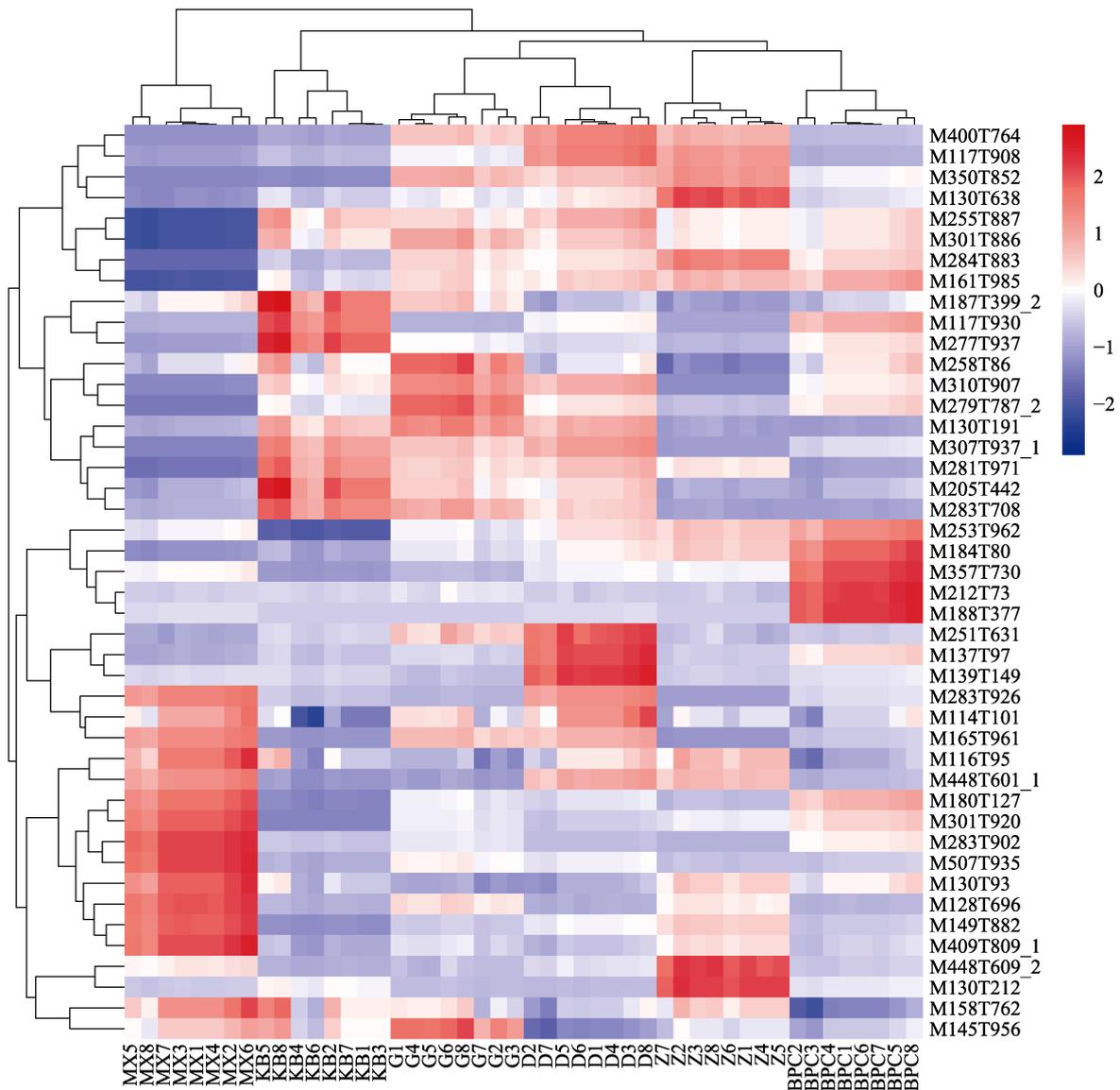
续表 3

注释编号	名称	<i>m/z</i>	保留时间/s	分子式	KEGG ID
M258T86	甘油磷酸胆碱	258.1087	86.3	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub> P	C00670
M350T852	$\alpha$ -亚麻酰乙醇酰胺	350.3056	851.7	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	C13828
M400T764	棕榈酰-L-肉碱	400.3433	764.0	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>4</sub>	C02990
M180T127	$\alpha$ -D-葡萄糖	180.0663	127.4	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C00267
M161T985	D-醛糖	161.0433	985.1	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C00737
M117T908	5-氨基戊酸	116.9284	908.3	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	C00431
M117T930	甲基丙二酸	116.9284	929.7	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C02170
M128T696	焦谷氨酸	128.0339	696.2	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	C01879
M130T93	肌酸	130.0617	92.7	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C00300
M130T638	异亮氨酸	130.0860	637.9	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	C00407
M130T191	亮氨酸	130.0861	191.2	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	C16439
M149T882	3-甲基腺嘌呤	149.0094	881.6	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	C00913
M251T631	2'-脱氧腺苷	251.0950	631.0	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	C00559
M255T887	软脂酸	255.2322	886.6	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C00249
M283T902	鸟苷	283.2632	901.9	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	C00387
M283T708	鹰嘴豆芽素 A	283.0689	708.1	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	C00814
M283T926	硬脂酸	283.2660	926.0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C01530
M277T937	$\alpha$ -亚麻酸	277.2172	936.5	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C06427
M281T971	(6Z)-十八碳烯酸	281.2479	970.7	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C08363
M301T886	鞘氨醇	301.2371	886.4	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	C00836
M448T601_1	甘氨酸去氧胆酸	448.3006	600.7	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	C05466
M507T935	三磷酸腺苷	507.1186	935.5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub>	C00002
M130T212	$\beta$ -亮氨酸	130.0860	212.3	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	C02486
M253T962	棕榈油酸	253.2161	961.8	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C08362
M279T787_2	牛次酸	279.2328	787.5	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C04056
M409T809_1	溶血磷脂酸(16:0)	409.2340	809.2	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	C04036
M307T937_1	二十碳二烯酸	307.2627	937.3	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C16525
M301T920	二十碳五烯酸	301.2153	919.5	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C06428

由表 3 可知,对 242 种代谢物进行差异代谢物的筛选,共筛选出 44 种差异代谢物。将表中 44 种差异代谢物进行分类,其属于脂质衍生物、脂肪酸及其结合物、氨基酸及其衍生物、碳水化合物及其结合物、嘌呤及其衍生物、有机胺、甘油磷脂。其中,前三类占据了多数,可能的原因是高尿酸血症会导致脂质代谢紊乱,这种效应呈浓度依赖性。高尿酸血症会促进脂肪合成相关酶的活性,降低酮体的含量,同时抑制脂肪酸氧化代谢肉碱棕榈酰转移酶(CPT1A)和酰化酶 1(ACADM)的活性<sup>[16]</sup>。而氨基酸代谢也在高尿酸血症中起着关键作用。研究发现,敲除了 Uox 基因(Uox-KO)的小鼠肠道微生物组和相关氨基酸代谢的改变导致高尿酸血症和辅助性 T 细胞 17(Th17)驱动的炎症。肠道微生物组和氨基酸代谢可能是治疗高尿酸血症的潜在靶点<sup>[17]</sup>。

图 8 为 44 种差异代谢物的聚类热图。聚类热图作为一种可视化工具,用于展示代谢物的表达水平或其他特征之间的相似性和差异性。

由图 8 可知,与其他组相比,MX 组中硬脂酸、肌酐、L-岩藻糖、脯氨酸、甘氨酸去氧胆酸、 $\alpha$ -D-葡萄糖、二十碳五烯酸、鸟苷、三磷酸腺苷、肌酸、焦谷氨酸、3-甲基腺嘌呤、溶血磷脂酸(16:0)表达升高,而软脂酸、鞘氨醇、硬脂酸酰胺(16:0)表达降低。BPC 组中表达上升的物质有磷酸胆碱、(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-二十二碳六烯酸乙酯、磷酸肌酸、(3S)-6-乙酰氨基-3-氨基己酸酯,这些物质可能在治疗过程中受到影响。刺梨提取物 D、Z、G 组中 2'-脱氧腺苷、1-甲基烟酰胺、尿刊酸、亮氨酸、甘氨酸、 $\beta$ -亮氨酸、甘油磷酸胆碱,表达增强,在提取物的影响下,这些物质可能因为代谢变化的影响而水平上升。



注: 红色为高表达, 红色越深, 表达越高; 蓝色为低表达, 蓝色越深, 表达越低

图 8 44 种差异代谢物的聚类热图

Fig. 8 Cluster heat map of 44 differential metabolites

## 2.6 差异代谢物代谢途径分析

通过途径富集分析, 可以根据代谢物在相关途径中的位置评估其在生物反应中的作用, 确定所涉及的代谢组学途径。将上述所有差异代谢物导入, 代谢途径分析结果以交互式可视化系统的形式呈现, 结果见图 9。

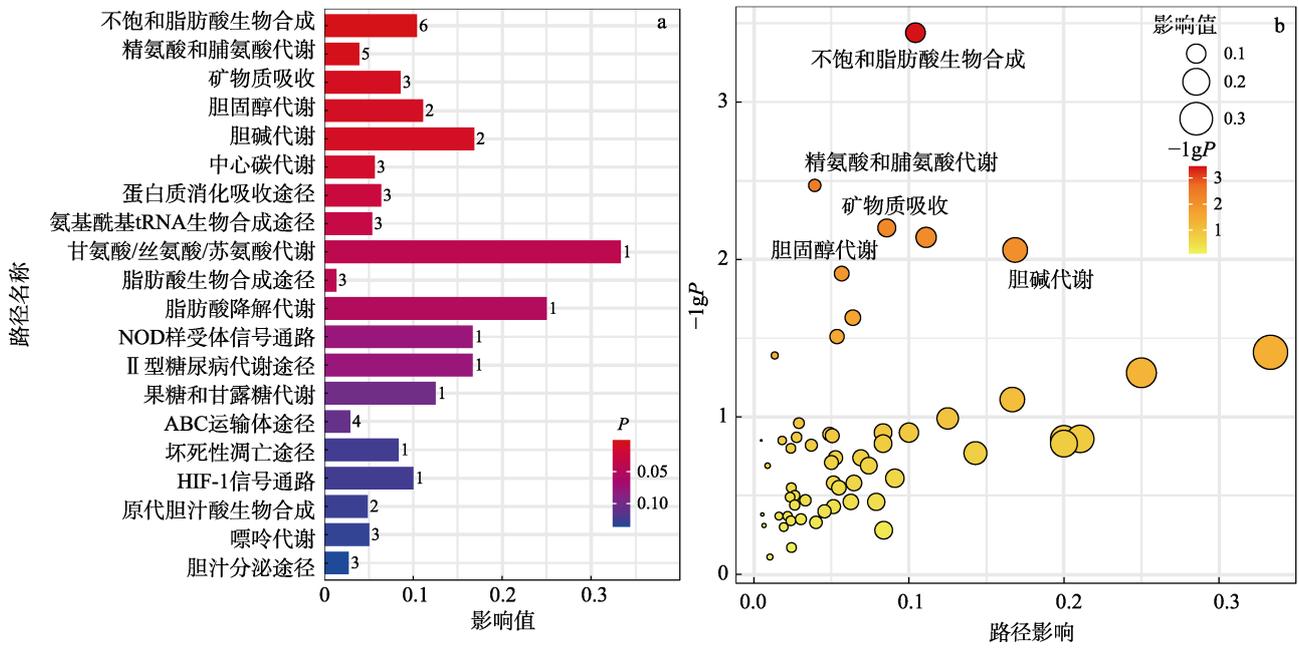
由图 9a 可见, 使用筛选出的 44 种差异代谢物 KEGG ID 进行 MBRole 2.0 通路分析, 以  $P$  为依据, 发现与之相关的代谢途径有 58 条, 仅展示  $P$  较小的 20 条代谢途径, 包括不饱和脂肪酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、矿物质吸收途径、胆固醇代谢、胆碱代谢、中心碳代谢、蛋白质消化吸收途径、氨基酰基转运 RNA (tRNA) 生物合成途径、甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢、脂肪酸生物合成途径、脂肪酸降解代谢、NOD 样受体信号通路、II 型糖尿病代谢

途径、ABC 运输体途径、坏死性凋亡途径、原代胆汁酸生物合成、嘌呤代谢、胆汁分泌途径、果糖和甘露糖代谢、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路。由图 9b 可知, 在高尿酸血症应答典型代谢物的途径中, 出现了包括不饱和脂肪酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、矿物质吸收途径、胆固醇代谢、胆碱代谢等途径。

MENG 等<sup>[18]</sup>研究表明, 高尿酸血症可以上调 B 细胞吸引趋化因子 1 (CXCL-13) 并干扰体内外的脂质代谢。高尿酸血症通过 CXCL-13 途径诱导脂质代谢紊乱, 使 CXCL-13 成为连接高尿酸血症和脂质代谢紊乱的关键调控因子。这都有可能其脂质类相关代谢途径发生变化的原因之一。根据一项研究, 高尿酸血症可以通过上调小鼠肝脏和人源正常肝细胞 (L-02) 中的缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 和抑制

精氨酸生物合成途径来诱导肝损伤。在尿酸刺激的 L-02 细胞中, 精氨酸途径 (或尿素循环) 中的相关代谢产物, 如 L-精氨酸和 L-精氨琥珀酸盐减少, 氨增加, 这是由合酶 1 (CPS1)、精氨琥珀酸合酶 (ASS) 和精氨琥珀酸裂解酶 (ASL) 下调介导的<sup>[19]</sup>。

SÁNCHEZ-LOZADA 等<sup>[20]</sup>研究发现, 急性和慢性服用 L-精氨酸 (内皮一氧化氮合酶的底物) 会对高尿酸血症引起的肾脏血流动力学和血管结构改变产生影响。高尿酸血症与胆固醇代谢之间存在一定的关系, 是导致动脉粥样硬化性心血管疾病的危险因素之一<sup>[21]</sup>。



a—差异代谢物富集途径的可视化分析; b—高尿酸血症应答中典型代谢物的途径分析

图 9 高尿酸血症代谢物显著改变的途径分析

Fig. 9 Analysis of pathway of significant changes in metabolites of hyperuricemia

血清胆固醇水平升高会加速动脉粥样硬化的发展, 尤其是在高尿酸血症状态下。通过药物降低尿酸可以降低与高尿酸和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 异常高水平相关的心血管死亡风险<sup>[22]</sup>。高尿酸血症具有不同的血清代谢组学特征, 与正常尿酸相比, 高尿酸血症患者各种通路都明显失调<sup>[23]</sup>。而刺梨提取物中富含多酚、多糖、黄酮等物质, 在降低血清尿酸, 调节代谢通路上有显著作用。目前, 抗高尿酸血症药物主要分为抗泌尿药物和促尿酸排泄药物<sup>[24]</sup>, 它们单独或组合用于减少尿酸的合成或改善其分泌。然而, 这些药物已经显现出副作用。例如: 每日服用 300~600 mg 的别嘌醇会导致肾衰竭、腹泻、皮肤皮疹和其他胃肠道问题、恶心、头痛和肝脏异常<sup>[25]</sup>。黄酮类、酚酸类、生物碱类、皂苷类和多糖类活性化合物通过 3 种方式来降低尿酸, 包括抑制尿酸生成、促进肾脏排泄尿酸和改善肠道排泄尿酸。辣木叶片 (MOL-FP) 中含有的大量黄酮类和酚类化合物已被证明对小鼠高尿酸血症具有治疗作用。MOL-FP 可以降低高尿酸血症小鼠的血清尿酸水平, 其作用机制是抑制 XOD 的活性来减少尿酸生成和调节肾脏中的尿酸盐转运蛋白<sup>[26]</sup>。分子对

接模拟表明, 黄酮类化合物与 XOD 结合的关键是它们的疏水作用。除了 C-4 位置上的羰基外, C-7 和 C-5 位置上的羟基也与 XOD 中大量氨基酸残基相互作用, 促进氢键和静电相互作用, 增加了黄酮类化合物与 XOD 之间的亲和力, 可以更强、更有效地抑制 XOD。SUN 等<sup>[27]</sup>研究发现, 多酚类中鞣花酸可以有效地抑制黄嘌呤氧化酶, 还可以抑制 NLRP3 炎性小体的激活, 对高尿酸血症有着有益的影响。LI 等<sup>[28]</sup>发现绿藻 *Enteromorpha prolifera* 多糖 (EPP) 通过调节尿酸转运蛋白来抑制高尿酸血症。EPP 能抑制血清 XOD 和肝脏 XOD 的活性, 显著降低血清尿酸。此外, 信使 RNA (mRNA) 和蛋白质表达分析显示, EPP 上调了尿酸排泄基因, 如膜转运蛋白 (ABCG2)、有机阴离子转运蛋白 1 (OAT1) 和钠依赖性磷酸转运蛋白 1 (NPT1), 下调了尿酸重吸收尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1)。刺梨提取物中含有上述研究中的黄酮、多酚、多糖等各类活性成分, 这些成分可能通过作用于大鼠体内与高尿酸血症相关的物质而影响各个代谢途径, 从而达到降低血清尿酸的目的, 而这一机制非常复杂, 需要后续进行更多细化的实验来研究解释。

图 10 为代谢物与代谢途径相互作用关系网络



- Determination of total polyphenols in *Rosa roxburghii* trutt fruit from guizhou and investigation of its drying method[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志), 2016, 22(23): 20-23.
- [7] GONZÁLZE-CASTTEJÓN M, RODRIGUEZ-CASADO A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review[J]. Pharmacological Research, 2011, 64(5): 438-455.
- [8] YANG Q X, WANG Q L, DENG W W, *et al.* Anti-hyperuricemic and anti-gouty arthritis activities of polysaccharide purified from *Lonicera japonica* in model rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 801-809.
- [9] LI Y B (李怡彬). Study on uric acid-lowering effect and molecular mechanism of polyphenols in *Prunus salicina* Lindl. cv. "Furong"[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2023.
- [10] LI T T (李婷婷), WANG Q (王沁), LI Y C (李煜辰), *et al.* Uric acid-lowering effects and mechanism of *Sanghuangporus vaninii* extracts and crude polysaccharides[J]. Mycosystema (菌物学报), 2023, 42(4): 997-1008.
- [11] DONG S Y (董师宇), ZHAO S (赵帅), YI J J (易洁), *et al.* Inhibitory effect of *Rosa roxburghii* Tratt ethanol extract on xanthine oxidase and its molecular mechanism[J]. Journal of Light Industry (轻工学报), 2022, 37(6): 42-49.
- [12] ZHANG A H, SUN H, WANG P, *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis[J]. Analyst, 2012, 137(2): 293-300.
- [13] XU Y Q (徐雅琴), HUANG Y M (黄耀民), HE M Y (和梦颖), *et al.* Study on the effect and mechanism of niaoduqing granules in improving chronic nephropathy in rats based on microbiology metabolomics[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine (中国中药杂志), 2023, 48(1): 160-169.
- [14] LI J Z (李娇珍), SUN Z H (孙正海), CAI Q H (蔡起航), *et al.* Analysis of chemical components in different parts of *Centella asiatica* based on LC-MS[J]. Western Forestry Science (西部林业科学), 2022, 51(4): 75-79, 86.
- [15] MA Y J (马雅洁). Study on the mechanism of the effect of different doses of bisphenol A on steroid sex hormones in adolescent male rats[D]. Shenyang: Shenyang Medical College (沈阳医学院), 2022.
- [16] LIU C H (刘春红). The mechanism of lipid metabolism disorder induced by high uric acid and the intervention effect of insulin-like growth factor-1[D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2021.
- [17] SONG S Y, LOU Y, MAO Y Y, *et al.* Alteration of gut microbiome and correlated amino acid metabolism contribute to hyperuricemia and Th17-driven inflammation in Uox-KO mice[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 201.
- [18] MENG J, LV Q L, SUI A H, *et al.* Hyperuricemia induces lipid disturbances by upregulating the CXCL-13 pathway[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2022, 322(2): G256-G267.
- [19] HUANG L, HE X Y, PENG W, *et al.* Hyperuricemia induces liver injury by upregulating HIF-1 $\alpha$  and inhibiting arginine biosynthesis pathway in mouse liver and human L02 hepatocytes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 617: 55-61.
- [20] SÁNCHEZ-LOZADA L G, TAPIA E, LÓPEZ-MOLINA R, *et al.* Effects of acute and chronic L-arginine treatment in experimental hyperuricemia[J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007, 292(4): F1238-F1244.
- [21] BAO R X, WANG W, CHEN B B, *et al.* Dioscin ameliorates hyperuricemia-induced atherosclerosis by modulating of cholesterol metabolism through FXR-signaling pathway[J]. Nutrients, 2022, 14(9): 1983.
- [22] PALATINI P, VIRDIS A, MASI S, *et al.* Hyperuricemia increases the risk of cardiovascular mortality associated with very high HDL-cholesterol level[J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2023, 33(2): 323-330.
- [23] SHEN X, WANG C, LIANG N N, *et al.* Serum metabolomics identifies dysregulated pathways and potential metabolic biomarkers for hyperuricemia and gout[J]. Arthritis & Rheumatology, 2021, 73(9): 1738-1748.
- [24] PANG C Z (逢成章), LIU W B (刘文彬), JIN X B (金小宝). Antihyperuricemia drug "relocation" based on disease gene expression profile and drug transcriptome[J]. Journal of Practical Medicine (实用医学杂志), 2022, 38(22): 2838-2844.
- [25] CAO H Y (曹慧雅), LI K W (李凯文), LI G (李阁), *et al.* Research progress on the mechanism of spleen invigorating and dampness removing herbs in treating hyperuricemia[J]. Central South Pharmacy (中南药学), 2022, 20(9): 2110-2116.
- [26] LUO X W, ZHOU L P, WANG S K, *et al.* The therapeutic effect and the potential mechanism of flavonoids and phenolics of *Moringa oleifera* Lam. leaves against hyperuricemia mice[J]. Molecules, 2022, 27(23): 8237.
- [27] SUN Z R, LIU H R, HU D, *et al.* Ellagic acid exerts beneficial effects on hyperuricemia by inhibiting xanthine oxidase and NLRP3 inflammasome activation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(43): 12741-12752.
- [28] LI X Q, GAO X X, ZHANG H, *et al.* The anti-hyperuricemic effects of green alga *Enteromorpha prolifera* polysaccharide via regulation of the uric acid transporters *in vivo*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 158: 112630.
- (上接第 340 页)
- [58] QUAN H D, TAMURA M, SEKIYA A. Process for production of carbonyl fluoride: US20100191013A1[P]. 2010-07-29.
- [59] WANG L X (王连心), YU J K (于剑昆), ZHANG J L (张景利). Research progress of chlorine trifluoride electronic gas[J]. Chemical Propellants & Polymeric Materials (化学推进剂与高分子材料), 2021, 19(3): 21-31.
- [60] SUN F N (孙福楠), YU D Q (于大秋). Present situation of new high-purity electronic gas for semiconductor manufacturing[J]. Low Temperature and Specialty Gases (低温与特气), 2017, 2(4): 1-3.
- [61] BHARDWAJ J K, SHEPHERD N, LEA L M, *et al.* Chlorotrifluorine gas generator system: US06929784B1[P]. 2005-08-16.
- [62] KRUPIN A G, KUZ MINYKH S A, LAZARCHUK V V, *et al.* Chlorine trifluoride preparation process: RU2223908C1[P]. 2004-02-20.
- [63] WANG X X (王新喜), LIU Z H (刘智慧), DING C (丁成), *et al.* A preparation method of chlorine trifluoride: CN104477849A[P]. 2015-04-01.
- [64] MASAKIYO N, SHIGERO S, AKIFUMI Y. Process for producing chlorine trifluoride: JP2018062427A[P]. 2018-04-19.
- [65] BAO Z B (鲍宗必), CHEN F Q (陈富强), HUANG X L (黄鑫磊), *et al.* A method for separating fluorine-containing electronic special gas: CN114288812A[P]. 2022-04-08.
- [66] CHEN G (陈刚), ZHANG X D (张晓东), ZHOU J S (周井森), *et al.* A preparation method of electronic grade hexafluoroethane: CN106242944B[P]. 2018-09-04.
- [67] HUANG Y L (黄媛玲), ZHOU W P (周文平), ZHANG Q Z (张前臻). A method for preparing electronic grade octafluoropropane: CN116283479A[P]. 2023-06-23.
- [68] MIAO B Y (苗宝雨), ZUO C Y (左春雨), TIAN D L (田丁磊), *et al.* Purification system and method of electronic grade octafluorocyclobutane: CN116212431A[P]. 2023-06-06.
- [69] ZHU J T (朱姜涛), FAN N (范娜), YAO G (姚刚), *et al.* A preparation method of high-purity nitrogen trifluoride and the application of high-purity nitrogen trifluoride: CN116003215A[P]. 2023-04-25.
- [70] DING Y (丁勇), JUN H (俊豪), FU Z H (傅铸红), *et al.* Purification method of electronic grade chlorine trifluoride: CN115321486A[P]. 2022-11-11.
- [71] GAN H P (甘华平), QIN Y W (秦远望), LI T (李涛), *et al.* A semiconductor device etching method using high purity electronic grade hexafluorobutadiene: CN113257671B[P]. 2021-10-12.
- [72] CHEN G (陈刚), ZHANG X D (张晓东), ZHANG G D (张广第), *et al.* A purification method of electronic grade octafluorocyclopentene: CN110483234B[P]. 2021-12-07.
- [73] LOH G, NAPA M J, LEE H, *et al.* Hydrofluoroolefin etching gas mixtures: WO2014160910A1[P]. 2014-10-02.
- [74] PENG S, GARY L. Chamber cleaning and semiconductor etching gases: WO2015103003A1[P]. 2015-07-09.
- [75] BURKHOLDER J B, COX R A, RAVISHANKARA A R. Atmospheric degradation of ozone depletion substances, their substitutes, and related species[J]. Chem Rev, 2015, 115: 3704-3759.
- [76] DU W H (杜伟华). Study on NF<sub>3</sub> extractive distillation process[J]. Low Temperature and Specialty Gases (低温与特气), 2009, 27(2): 14-17.