

## 基于代谢组学分析香蜂草苷抗非酒精性脂肪肝病的作用机制

方斌<sup>1</sup>,莫柔<sup>1</sup>,黄仁彬<sup>1</sup>,黄权芳<sup>2</sup>

(1.广西医科大学,南宁 530021;2.广西中医药大学第一附属医院药学部,南宁 530023)

**摘要** **目的:**基于非靶向代谢组学和生物信息学方法研究香蜂草苷抗非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的作用机制。**方法:**将18只雄性SD大鼠随机分为正常对照组、模型组和香蜂草苷组(3 mg/kg),每组6只。使用高脂饲料喂养8周诱导建立NAFLD大鼠模型。香蜂草苷组每天灌胃给予香蜂草苷治疗8周,正常对照组和模型组灌胃给予等量生理盐水。采用苏木精-伊红(HE)染色和油红O染色观察各组大鼠肝组织病理学变化。使用超高效液相-质谱(UPLC-Xevo G2-XS QToF)检测大鼠肝匀浆代谢物,以 $P<0.05$ 和变化倍数(|FC|) $>2$ 为标准筛选差异代谢物,进行代谢物分类富集分析;以总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、游离脂肪酸(FFA)和胰岛素抵抗(IR)等NAFLD相关指标为疾病表型,构建加权代谢共表达网络分析(WMCNA),筛选出与NAFLD相关的核心代谢物。取差异代谢物和核心代谢物交集进行生物标志物分析。**结果:**与模型组比较,香蜂草苷组大鼠体重降低,肝脏脂质沉积减少,肝脏病理损伤减轻。代谢组学结果表明,共筛选出差异代谢物126个,其中上调50个,下调76个(香蜂草苷组 vs. 模型组)。WMCNA筛选出核心代谢物189个,主要为磺酸及其衍生物、脂肪酸化合物。取差异代谢物和核心代谢物交集在MetaboAnalyst在线数据库分析可得25个潜在生物标志物,其中脂酰类化合物 Isopropylmalic acid ( $P<0.05$ , FC=-2.81)和脂肪酸生成相关化合物 Alpha-Linoleoylcholine ( $P<0.05$ , FC=-1.39)、3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA ( $P<0.05$ , FC=-1.78)变化差异具有统计学意义。**结论:**香蜂草苷可能通过调节 Isopropylmalic acid、Alpha-Linoleoylcholine 和 3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA 的代谢水平,起到改善NAFLD的作用,为缓解脂质代谢紊乱提供前期实验基础。

**关键词** 香蜂草苷;非酒精性脂肪肝病;代谢组学;加权代谢物共表达网络分析

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2024)08-1111-09

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.002

### Research on mechanism of anti-nonalcoholic fatty liver disease by didymin based on metabolomics

FANG Bin<sup>1</sup>, MO Rou<sup>1</sup>, HUANG Renbin<sup>1</sup>, HUANG Quanfang<sup>2</sup>. (1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Pharmaceutical Department, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

**Abstract** **Objective:** To study the mechanism of anti-nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) by didymin based on non-targeted metabolomics and bioinformatics methods. **Methods:** Eighteen male SD rats were randomly divided into normal group, model group, and didymin group (3 mg/kg), with 6 rats in each group. NAFLD rat model was induced by feeding high-fat diet for 8 weeks. The didymin group was given vanillin every day for 8 weeks, and the normal group and model group were given the same amount of normal saline. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Oil Red O staining were used to observe the histopathological changes of liver in each group. The metabolites of rat liver homogenate were detected by ultra-high-performance liquid-mass spectrometry (UPLC-Xevo G2-XS QToF). The differential metabolites were screened based on criteria of  $P<0.05$  and the change ratio (|FC|) $>2$ , and the metabolites were classified and enriched. Using total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), free fatty acid (FFA), insulin resistance (IRI) and other NAFLD-related indicators as disease phenotypes, weighted metabolites correlation network analysis (WMCNA) was built and the hub metabolites associated with NAFLD were screened. The intersection of dif-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82060755)

[通信作者] 黄仁彬, E-mail: huangrenbin518@163.com; 黄权芳, E-mail: g723m6@sina.com

[收稿日期] 2024-08-13

ferential metabolites and hub metabolites was analyzed for biomarkers. **Results:** Compared with the model group, the didymin group could reduce body weight, liver lipid deposition and liver damage in rats. Metabolomics results showed that 126 differential metabolites were selected, of which 50 were up-regulated and 76 were down-regulated (didymin group vs. model group). WMCNA screened 189 hub metabolites, mainly sulfonic acid and its derivatives, fatty acyl compounds, and 25 potential biomarkers were obtained by the intersection of the differential metabolites and hub metabolites in Metaboanlyst dataset. Among them, the differences in the fatty acyl compound Isopropylmalic acid ( $P < 0.05$ ,  $FC = -2.81$ ) and the fatty acid-related compounds Alpha-Linoleoylcholine ( $P < 0.05$ ,  $FC = -1.39$ ) and 3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA ( $P < 0.05$ ,  $FC = -1.78$ ) were statistically significant. **Conclusion:** Didymin may play a role in improving NAFLD by regulating the metabolic levels of Isopropylmalic acid, Alpha-Linoleoylcholine and 3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA. It provides the preliminary experimental basis for alleviating the disorder of lipid metabolism.

**Keywords** didymin; non-alcoholic fatty liver disease; metabolomics; weighted metabolites correlation network analysis

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一类由甘油三酯(triglyceride, TG)在肝脏内过度蓄积而肝脂肪变性的代谢性疾病,其主要特征为脂质代谢紊乱并伴随有高脂血症和胰岛素抵抗<sup>[1-2]</sup>,进一步发展可能会形成肝纤维化,甚至肝癌。因此,寻找理想的治疗药物对于治疗NAFLD、调节代谢紊乱有着重要的临床应用价值。

香蜂草苷具有抗炎、抗氧化、调节脂质代谢和保护肝脏的作用<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期研究发现,香蜂草苷对急性肝损伤和肝纤维化有较好的治疗作用<sup>[5-6]</sup>。但香蜂草苷在NAFLD发病进展中对脂质相关代谢产物是否有影响尚不明确。

加权共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)<sup>[7-8]</sup>是一种用来描述不同样品之间基因关联模式的生物信息学方法,其可以将海量复杂的基因数据转换为共表达模块,特异性的筛选出与临床性状相关的基因。利用这个原理也可用于筛查出与临床特征最为相近的代谢物模块,目前,WGCNA分析已被广泛用于筛选各类药物干预后的疾病生物标志物<sup>[9]</sup>,但在对于筛选NAFLD相关的代谢生物标志物方面的研究仍比较缺乏。因此,本研究旨在探寻香蜂草苷对NAFLD代谢物的影响,利用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-LC/MS)对NAFLD大鼠肝匀浆进行检测,筛选差异代谢物。通过构建加权代谢物共表达网络(weighted metabolites correlation network analysis, WMCNA)筛选出核心代谢物,结合两者分析香蜂草苷干预后NAFLD潜在的生物标

志物,为今后临床治疗以及药物研究提供新的方向和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF级SD雄性大鼠20只,体重(120±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,大鼠饲养在温度(25±2)°C,湿度40%~60%,每日光照时间12h的环境中。动物生产许可证:SCXK(桂)2020-0003,动物使用许可证:SYXK(桂)2020-0004。本研究涉及的动物实验均经广西医科大学动物伦理委员会批准(审核编号:202102007)。

### 1.2 药物与试剂

香蜂草苷(纯度>98%),批号:14259-47-3,上海源叶生物科技有限公司;高脂饲料(配方配比:胆固醇1%、猪油10%、蛋黄粉10%、基础料79%),批号:2021021513,北京博爱港生物技术有限公司;甲酸(LC-MS)级,上海吉至生化科技公司;乙腈(LC-MS级)、甲醇(LC-MS级),美国赛默飞公司。

### 1.3 主要仪器

Xevo G2-XS QTOF/MS,美国Waters公司;CX43正置生物显微镜,日本奥林巴斯公司;SWE-FP低温研磨仪,武汉赛维尔生物科技有限公司。

### 1.4 实验分组及NAFLD模型复制

适应性喂养1周后,将20只SD大鼠随机分为正常对照组(6只)和模型复制组(14只),正常对照组大鼠给予基础饲料喂养,模型复制组大鼠给予高脂饲料喂养诱导建立NAFLD模型,持续喂养8周。第8周末随机从模型复制组中选择2只大鼠,取其

肝脏行油红O染色,观察脂滴堆积情况,以判断造模情况。确定成功建立NAFLD模型后,将模型复制组12只大鼠随机分为模型组和香蜂草苷组,每组6只。造模成功后开始给药,除模型复制组大鼠每天继续给予高脂饮食外,香蜂草苷组每天灌胃给予3 mg/kg香蜂草苷治疗8周<sup>[1]</sup>,正常对照组和模型组灌胃给予等量生理盐水。

### 1.5 肝组织病理学检查<sup>[6]</sup>

称重后。末次给药后禁食12 h取下肝脏后,用生理盐水洗净,从肝左叶切下5 mm×2 mm×3 mm组织块,放入10%福尔马林中固定24 h,石蜡包埋、切片,行苏木精—伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,置于显微镜下观察大鼠肝脏组织病理形态变化。油红O染色:取大鼠新鲜肝脏后立刻用OCT包埋剂包裹后冰冻切片,置于显微镜下观察肝脏组织细胞内脂滴堆积情况。

### 1.6 代谢组学样本制备

非靶向代谢组学样本使用配备四极杆飞行时间质谱的超高效液相色谱仪(UPLC-Xevo G2-XS QToF, Waters, 美国)进行检测。随机选取正常对照组、模型组和香蜂草苷组大鼠各6只,取肝脏60 mg于离心管中,加入混合溶剂(甲醇:乙腈:水=2:2:1)600  $\mu$ L,匀浆(70 Hz,运行15 s,停10 s,重复4次),转速设定12 000 r/min,离心15 min后得到400  $\mu$ L上清液,过0.22  $\mu$ m滤膜后上机检测<sup>[10]</sup>。

### 1.7 UPLC-MS分析条件

从每份肝匀浆样本中各吸取10  $\mu$ L混合,涡旋1 min混匀作为制备质控(quality control, QC)样本,过滤上机检测。色谱条件见表1。使用Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 mm),流速为0.4 mL/min,柱温箱温度45  $^{\circ}$ C,样品室温度4  $^{\circ}$ C,进样量5  $\mu$ L。质谱条件:正离子模式,扫描范围50~1 200 Da。离子源温度为150  $^{\circ}$ C,脱溶剂温度为350  $^{\circ}$ C。毛细管电压为250 kV,锥体电压为40 V。氮气作为鞘气(50 L/h)和脱溶剂气(800 L/h)。

### 1.8 数据分析及处理

代谢数据使用Progenesis Q1 V2.4分析,通过SIMCA-P 14.1软件进行无监督主成分分析(PCA)、监督正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),以 $P < 0.05$ 和 $|FC| > 2$ <sup>[11]</sup>筛选出差异代谢物。

使用自撰写R语言构建WMCNA网络,针对训练集的代谢物表达进行聚类分析,根据代谢物间的无标度拓扑拟合指数(R2)以及平均连接度,设定软

阈值为6(阈值 $cex1=0.85$ ),通过构建共表达网络灰值模块聚类树状图,将所有的代谢物分为多个模块,以非酒精性脂肪肝相关指标总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG、低密度脂蛋白(high-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, IRI)为对应指征,使用Pearson法分析代谢物与指征间的相关性,获得模块—性状关系图,选择 $P < 0.05$ 且相关性高的模块作为感兴趣的模块,然后根据模块成分(module membership, MM)和代谢物显著性(metabolite significance, MS)筛选核心代谢物,MM检测每种代谢物与模块特征因子(module eigengene, ME)的相关性,MS被定义为在此分析中代谢物与分组变量的相关性。以 $MM > |0.8|$ 和 $MS > |0.5|$ 为筛选条件,筛选出的代谢物认为是核心代谢物。

使用MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行代谢物富集分析及绘制相关性热图和相关性网络图以及生物标志物的筛选。使用GraphPad Prism 8.0实现数据可视化。

表1 色谱条件

时间/ min	流动相A% (0.1%甲酸—水, V/V)	流动相B% (0.1%甲酸—乙腈, V/V)
1	95	5
2	95	5
4	60	40
6	40	60
9	25	75
11	20	80
12	15	85
13	10	90
14	95	5
15	95	5

### 1.9 统计学方法

使用SPSS 17.0软件进行数据分析,所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组之间使用单因素方差分析进行比较,两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NAFLD大鼠体重及肝脏病理变化

模型组大鼠体重较正常对照组增长更快,在第

56天开始给予香蜂草苷治疗后,香蜂草苷组大鼠体重增长有所减缓(图1A)。

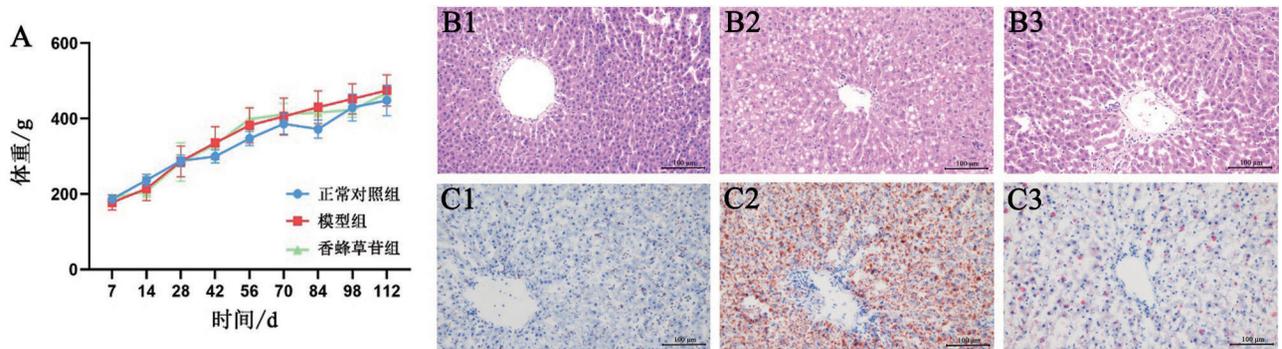
HE染色显示,正常对照组大鼠肝细胞形态清晰,未见明显的脂肪变性,肝细胞索排列整齐呈放射状;模型组大鼠肝细胞变性严重,肝细胞排列紊乱,可见炎性细胞、坏死细胞增多,且可观察到脂滴蓄积于肝细胞细胞质中所处形成的空泡;香蜂草苷组可见肝组织病理损伤有明显减轻,空泡减少,肝细胞形态清晰,见图1B1~B3。

油红O结果显示,正常对照组未见脂滴形成,模型组大鼠肝细胞内贮存大量红色脂滴,在给予香蜂草苷治疗后,脂滴明显减少,见图1C1~C3。以上结果表明,香蜂草苷可以调节NAFLD大鼠体重,改善肝细胞损伤,减少脂滴蓄积。

### 2.2 NAFLD大鼠肝脏代谢组学分析

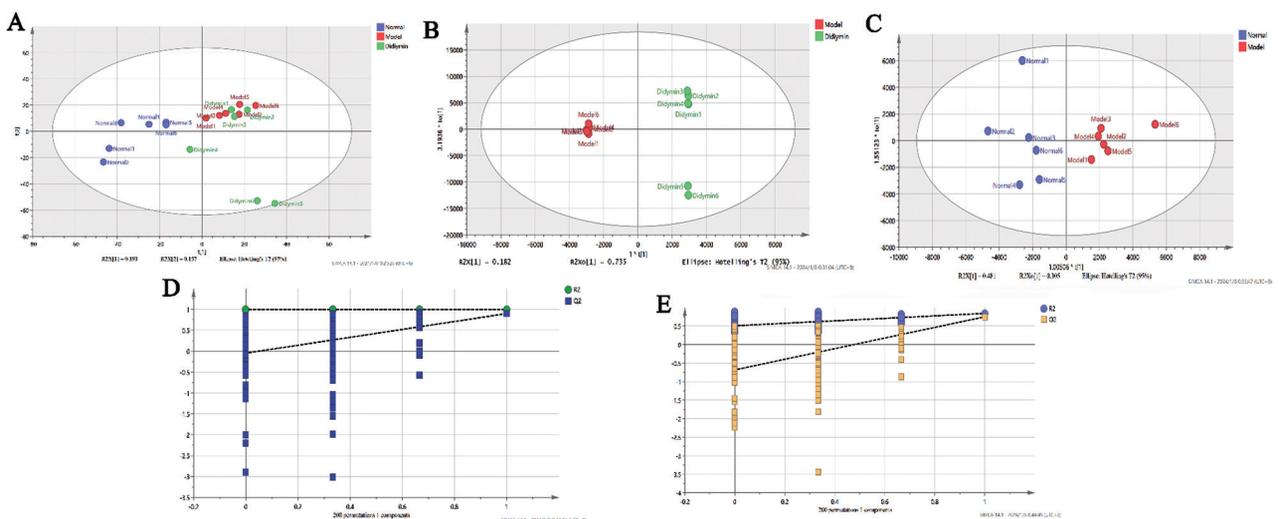
**2.2.1 PCA检测** 采用PCA法检测各组之间的内在聚类关系,如图2A所示,在无监督模式下,模型组与正常对照组分离,表明两组肝组织代谢物之间存在差异,给予香蜂草苷治疗后,香蜂草苷组代谢物向正常对照组靠近。

**2.2.2 OPLS-DA** 如图2D、图2E所示,在进行200次置换检验后,Q2<R2原始点,且与y轴截距小于0,符合置换检验标准。对模型组、香蜂草苷组和正常对照组一模型组进行OPLS-DA分析(图2B、图2C),监督模式下,OPLS-DA显示模型组与香蜂草苷组、正常对照组与模型组之间分离明显,以上结果表明模型结果具有可靠性,组间代谢物有显著差异。



A:大鼠体重变化图;B1~B3分别为正常对照组、模型组和香蜂草苷组HE染色图( $\times 200$ );C1~C3分别为正常对照组、模型组和香蜂草苷组油红O染色图( $\times 200$ )。

图1 香蜂草苷对NAFLD大鼠体重和肝组织病理损伤的影响



A:PCA图;B:模型组一香蜂草苷组OPLS-DA图;C:正常对照组一模型组OPLS-DA图;D:模型组一香蜂草苷组置换检验图;E:正常对照组一模型组置换检验图。

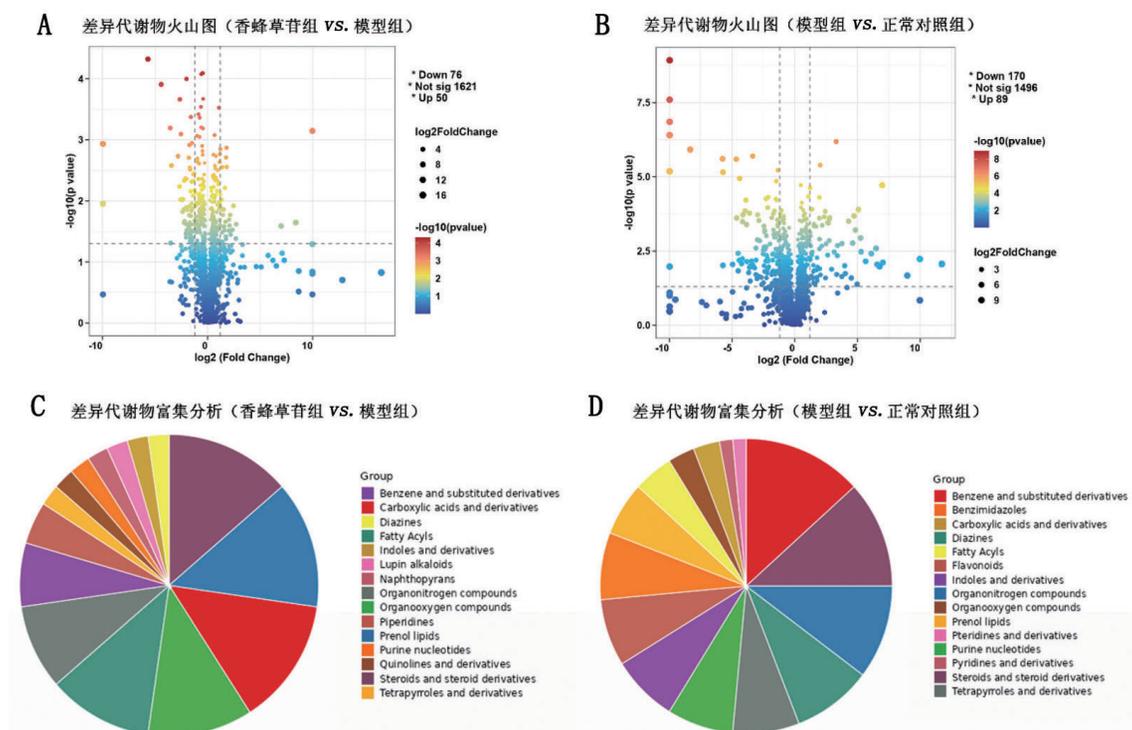
图2 肝匀浆代谢轮廓分析

**2.2.3 差异代谢物的筛选及富集分析** 非靶向代谢组学共检测出 2 135 个代谢物,以  $P < 0.05$  和  $|FC| > 2$  为筛选标准筛选出差异代谢物,由图 3A 可知,在香蜂草苷组和模型组的差异代谢中共筛选出 126 个差异代谢物,其中上调 50 个,下调 76 个,富集分析结果表明(图 3C),大多数差异代谢物是与脂质相关的脂肪酸类(fatty acyls)、孕烯醇酮脂类(prenol lipids)、类固醇及其衍生物(steroids and steroids derivatives)。图 3B 显示,在模型组—正常对照组中共有 89 个上调代谢物和 170 个下调代谢物,其中有一部分是与脂质相关的脂肪酸类和孕烯醇酮脂类代谢物(图 3D)。以上结果表明,香蜂草苷可能通过调节脂肪酸类代谢物影响 NAFLD。

**2.3 基于 WMCNA 网络筛选相关特异性代谢模块及核心代谢物分析** 为了描述代谢物与 NAFLD 表型(TC、TG、LDL、HDL、FFA 和 IRI)之间的关联关系,寻找协同表达的代谢物模块(module),本研究使用 WMCNA 方法构建的共表达网络,由图 4A、图 4B 可知,其软阈值为 6(soft power=6),按照混合动态剪切标准进行模块划分,将 2 135 个代谢物划分为 34 个不同颜色的共表达模块,数据表达相似的代谢物聚类形成同一个分支(图 4C)。计算各模块与 NAFLD 临床指征的 Person 相关系数,分析各代谢模块与 NAFLD 各指标的相关性,绘制模块与

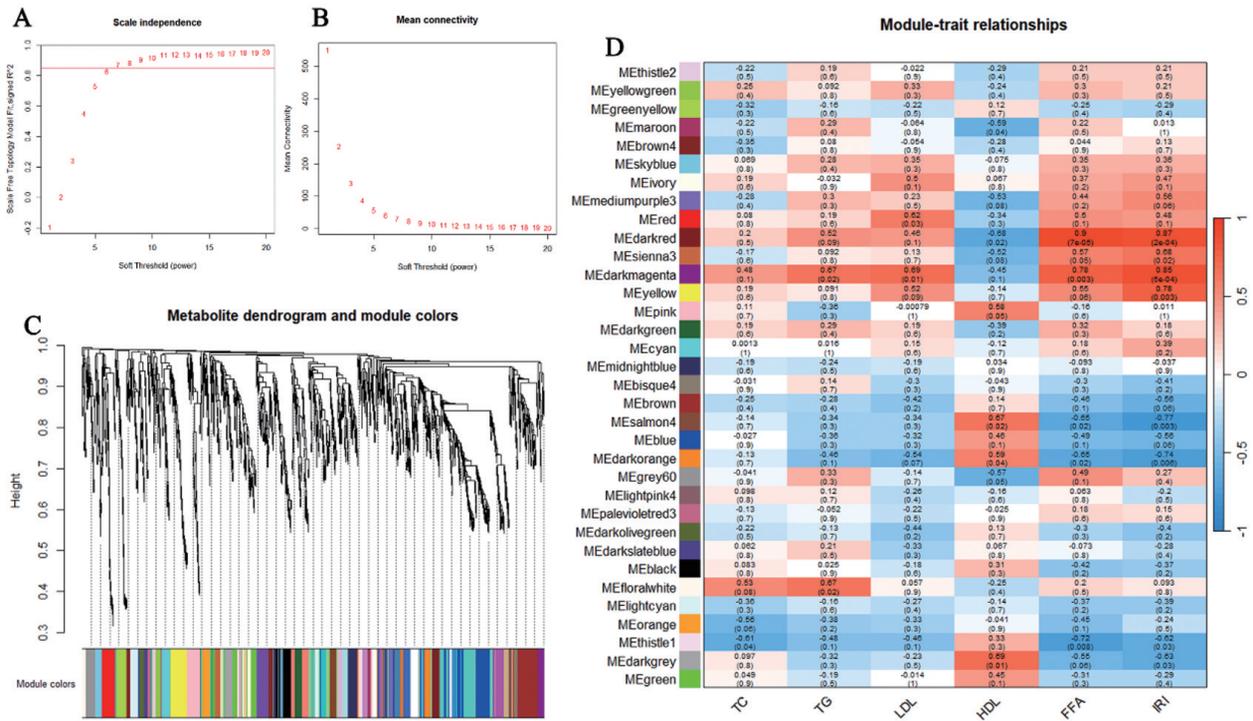
NAFLD 指征相关性分析图(图 4D),图中红色部分表示正相关关系,蓝色部分表示负相关关系,灰色模块表示未被分配的代谢物。由图可知,深红色(darkred)模块与 IRI( $r=0.87, P=2 \times 10^{-4}$ )、FFA( $r=0.9, P=7 \times 10^{-5}$ )和 HDL( $r=-0.68, P=0.02$ )具有相关性;暗洋红色(darkmagenta)模块与 TG( $r=0.67, P=0.02$ )呈正相关关系,花白色(floralwhite)与 TG 呈正相关关系( $r=0.67, P=0.02$ ),暗灰色(darkgrey)与 HDL( $r=0.69, P=0.01$ )呈正相关关系。苍紫(thistle)与 FFA( $r=-0.72, P=0.008$ )呈负相关关系,与 TG 差异无统计学意义( $r=-0.48, P=0.1$ ),浅橙色(salmon)与 IRI( $r=-0.77, P=0.003$ )呈负相关关系。因此选取这些模块的代谢物用于后续分析。

以 MM 和 MS 为标准筛选出深红色、暗洋红色、暗灰色、苍紫色和浅橙 5 个模块核心代谢物<sup>[12]</sup>,花白色模块  $P=0.24$ ,故舍去(图 5A~5E),去重后共 189 个代谢物,选取这 189 个差异代谢物进行 GO 富集和 KEGG 分析,结果显示,核心代谢物主要是脂肪酸类、孕烯醇酮脂类、类固醇及其衍生物(图 5F),KEGG 结果表明,其代谢物参与了脂肪酸代谢的降解(图 5G)。以上结果提示,香蜂草苷可能通过影响脂肪酸降解过程中的代谢物改善 NAFLD,与差异代谢物富集分类结果相符。



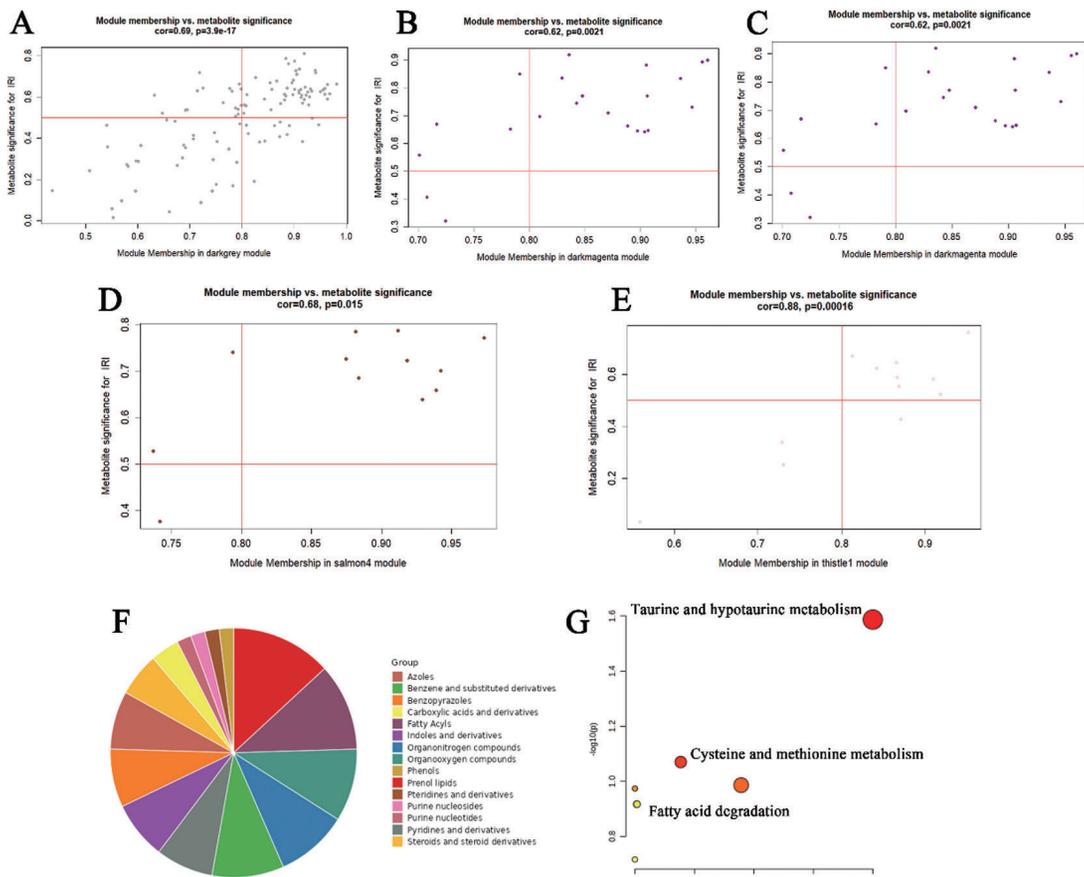
A: 模型组—香蜂草苷组差异代谢物火山图; B: 模型组—正常对照组差异代谢物火山图; C: 代谢物分类富集分析(香蜂草苷组 vs. 模型组); D: 代谢物分类富集分析(模型组 vs. 正常对照组)。

图 3 肝匀浆差异代谢物分析



A、B: power图; C: 聚类树状图; D: 模块与NAFLD指征相关性分析图。

图4 NAFLD大鼠WGCNA分析



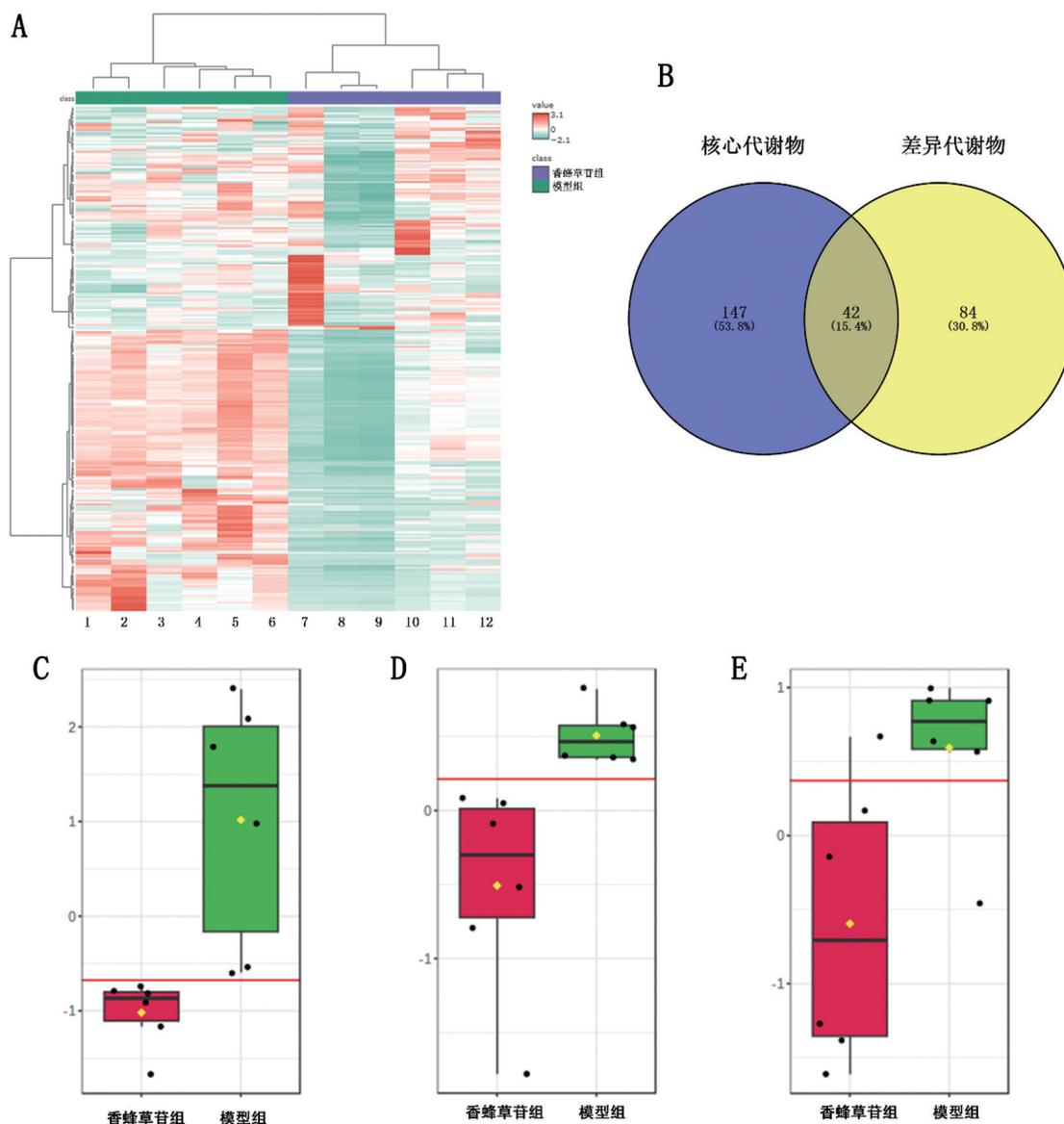
A~E分别为深灰、暗洋红、深红、浅橙和苍紫色MM和MS关系图; F: 核心代谢物分类富集分析; G: 核心代谢物通路分析。

图5 模块代谢物分析

### 2.4 核心代谢物和差异代谢物的联合分析

选取核心代谢物和差异代谢物进行富集分析,由相关性热图可知(图6A),模型组和香蜂草苷组之间的代谢物有明显的差别。取核心代谢物和差异代谢物交集,得到42个代谢物(图6B)。对交集代

谢物进行生物标志物分析,筛选具有显著差异得潜在生物标志物,并对其进行定量分析,见图6C~6E,其中3个脂质代谢相关代谢物2-Isopropylmalic acid、Alpha-Linoleoylcholine和3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA被认为符合要求的代谢物。



A: 核心代谢物和差异代谢物热图; B 核心代谢物和差异代谢物 Venn 图; C~E 分别为 2-Isopropylmalic acid、Alpha-Linoleoylcholine 和 3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA 的定量分析图。

图6 核心代谢物和差异代谢物联合分析

## 3 讨论

NAFLD 是一类代谢紊乱性疾病,通过使用药物调节糖脂代谢、促进脂肪酸氧化,改善胰岛素抵

抗以及减轻氧化应激和炎症可以达到改善 NAFLD 的目的<sup>[12-13]</sup>。本课题组前期研究发现香蜂草苷可以通过调节 TLR4/NF-κB 和 PI3K/Akt 信号通路来缓解地塞米松联合高脂饲料诱导的 NAFLD,但香蜂草苷对 NAFLD 发病进程中代谢产物的影响尚不明

确。代谢物是机体内参与各类新陈代谢的新分子物质,目前已成为了了解疾病发展进程的关键标志物。本研究选用高脂饲料诱导SD大鼠建立NAFLD模型,肝脏病理结果表明,香蜂草苷可以有效改善大鼠肝细胞中的脂质沉积和空泡变性,提示香蜂草苷可以有效减轻肝脏损伤。进一步的代谢组学研究发现,持续喂养高脂饮食可以导致大鼠肝匀浆代谢轮廓的改变,在给与香蜂草苷干预后,这种改变得到了一定程度的改善。与模型组相比,香蜂草苷组共有50个上调差异代谢物和76个下调差异代谢物,这些差异代谢物主要是是与脂质合成相关的脂肪酸类、异戊烯醇脂和类固醇及其衍生物。为了挖掘与NAFLD临床指征相关的核心代谢物,本研究采用了WMCNA,选取了与TC、TG、LDL、HDL、FFA和IRI等临床指征最相关的5个代谢物模块,共189个核心代谢物,这些代谢物参与了脂肪酸降解的过程。取差异代谢物和核心代谢物交集进一步生物标志物分析,发现了25个具有显著性差异的生物标志物,其中与脂质相关的有2-Isopropylmalic acid、Alpha-Linoleoylcholine和3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA 3,提示这3个代谢物可能作为香蜂草苷改善NAFLD的潜在生物标志物。

研究发现,2-Isopropylmalic acid是一类羟基脂肪酸有机化合物,其主要参与了亮氨酸代谢通路中的合成过程<sup>[4]</sup>,亮氨酸作为天然氨基酸之一具有疏水性的烷基侧链,对于肝脏的脂质代谢有着重要的调节作用<sup>[5]</sup>,补充亮氨酸可以增加体脂流失<sup>[6]</sup>,或减少脂肪积累<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,香蜂草苷组2-Isopropylmalic acid的消耗增加,这可能导致亮氨酸合成增多,进而影响大鼠肝脏的脂质蓄积;Alpha-Linoleoylcholine是alpha-Linoleic acid和胆碱反应的产物,其前体alpha-Linoleic acid可以有效改善大鼠的胰岛素抵抗和氧化应激<sup>[8]</sup>,进而缓解NAFLD的发病进展,与香蜂草苷组相比,模型组的Alpha-Linoleoylcholine含量高,可能是在体内被酯化后无法发挥作用。3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA参与了不饱和脂肪酸 $\beta$ -氧化过程<sup>[9]</sup>,这一过程有利于稳定体内脂质水平。该物质可能在体内脂肪酸 $\beta$ -氧化过程中被除去,导致香蜂草苷组和正常对照组表达量低,模型组表达量高。以上结果表明,香蜂草苷可能通过影响这3个生物标志物及其所属的代谢过

程,从而改善NAFLD导致的脂质代谢紊乱,提示香蜂草苷可以作为防治脂质代谢紊乱疾病的候选物。然而,NAFLD涉及多个器官及系统的代谢变化,因此之后的研究,除了对肝匀浆进行非靶向代谢组学检测筛选生物标志物外,未来还会对NAFLD大鼠的血清、肾脏以及肠道菌群等进行检测,获得更全面的代谢信息。

综上所述,香蜂草苷可减少高脂饲料诱导的NAFLD大鼠肝脏脂质堆积,改善NAFLD导致的脂质代谢紊乱。代谢组学和生物信息学分析结果表明,香蜂草苷的可能作用靶点为2-Isopropylmalic acid、Alpha-Linoleoylcholine和3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA。以上结果为今后开发保健品、药品防治NAFLD提供了实验依据。

## 参考文献:

- [1] FERGUSON D, FINCK B N. Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus [J]. *Nature reviews endocrinology*, 2021, 17(8): 484-495.
- [2] DING X, JIAN T, LI J, et al. Chicoric acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease via the AMPK/Nrf2/NF $\kappa$ B signaling pathway and restores gut microbiota in high-fat-diet-fed mice [J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 2020: 1-20.
- [3] YAO Q, LIN M T, ZHU Y D, et al. Recent trends in potential therapeutic applications of the dietary flavonoid didymin [J]. *Molecules*, 2018, 23 (10): 1-15.
- [4] LI Q, ZHANG H, LIU X. Didymin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by activating the PPAR signaling pathway [J]. *Yonsei medical journal*, 2022, 63(10): 956-965.
- [5] LI Y, LI C, XIONG Y, et al. Didymin ameliorates liver fibrosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and glycerophospholipid metabolism: based on transcriptomics and metabolomics [J]. *Drug design, development and therapy*, 2022, 16: 1713-1729.
- [6] FENG Z, PANG L, CHEN S, et al. Didymin ameliorates dexamethasone-induced non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt pathways in C57BL/6J mice [J]. *International immunopharmacology*, 2020, 88: 107003.
- [7] 梁雨晨, 张会, 郑晓梅, 等. 基于WGCNA探究薰衣草

- 耐寒关键基因及分子调控机制[J]. 分子植物育种, 2023, 1:13.
- [8] 安 敏, 杨晓玲, 马 亮, 等. 基于 WGCNA 分析鉴定糖尿病肾病新的诊断标志物 [J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(11): 1281-1287.
- [9] LI Z, GAO J, LIN L, et al. Untargeted metabolomics analysis in drug-naïve patients with severe obsessive-compulsive disorder [J]. *Frontiers in neuroscience*, 2023, 17: 1148971 .
- [10] XIONG Y, WEN S, LI Y, et al. Comprehensive analysis of transcriptomics and metabolomics to illustrate the underlying mechanism of helenalin against hepatic fibrosis [J]. *European journal of pharmacology*, 2022, 919: 174770.
- [11] YANG L, BI L, JIN L, et al. Geniposide ameliorates liver fibrosis through reducing oxidative stress and inflammatory response, inhibiting apoptosis and modulating overall metabolism [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2021, 12: 772635.
- [12] NASSIR F. NAFLD: Mechanisms, treatments, and biomarkers [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 1-32.
- [13] RONG L, ZOU J, RAN W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Frontiers in endocrinology*, 2023, 13: 1087260.
- [14] 蒋振雄, 王 鹏, 马新雨, 等. 以亮氨酸合成为例刍议代谢中的生物化学相似性规律 [J]. *大学化学*, 2019, 34(5): 80-87.
- [15] 严国楷. 亮氨酸调节 mTORC1 及脂肪酸 $\beta$ 氧化的机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [16] DONATO J, PEDROSA R G, CRUZAT V F, et al. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction [J]. *Nutrition*, 2006, 22(5): 520-527.
- [17] VIANNA D, RESENDE G F T, TORRES-LEAL F L, et al. Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats [J]. *Nutrition*, 2012, 28(2): 182-189.
- [18] 汪 婷, 张晓霞, 李一唯, 等. 亚麻籽油对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗和氧化应激的保护作用 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(7): 17-24.
- [19] TOR E. SMELAND M N D C, AND HORST SCHULZ. NADPH-dependent  $\alpha$ -oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1992, 89(15): 6673-6677.

本文引用格式:

方 斌, 莫 柔, 黄仁彬, 等. 基于代谢组学分析香蜂草苷抗非酒精性脂肪肝病的作用机制[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(8): 1111-1119. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.002

FANG B, MO R, HUANG R B, et al. Research on mechanism of anti-non-alcoholic fatty liver disease by didymin based on metabolomics[J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(8): 1111-1119. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.08.002