

祁淑雯,仲烨伟,阿达来提·阿布都热西提,等. 基于靶向代谢组学技术研究毛菊苣对肥胖小鼠粪便胆汁酸谱的影响[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1122-1138.

QI S W, ZHONG Y W, ADALAITI A B D R X T, et al. Effect of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profile in obese mice based on targeted metabolomics technique [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1122-1138.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.004

基于靶向代谢组学技术研究毛菊苣对肥胖小鼠 粪便胆汁酸谱的影响

祁淑雯,仲烨伟,阿达来提·阿布都热西提,张芮,侯文慧,张春子,
马晓燕,马晓丽*

(新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探究毛菊苣乙醇提取物对高脂饮食诱导的肥胖小鼠粪便胆汁酸谱的影响。**方法** 选取6周龄C57BL/6雄性小鼠24只随机分为正常组、模型组、给药组和二甲双胍组。正常组给予常规饮食,其余3组给予高脂饲料,同时给药组每日灌胃10 mL/kg毛菊苣乙醇提取物溶液,二甲双胍组每日灌胃10 mL/kg二甲双胍溶液。10周后收集小鼠肝检测肝甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C);收集小鼠粪便通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测粪便胆汁酸含量。**结果** 与正常组相比,模型组小鼠体重($P < 0.0001$)、血清TG、TC、LDL-C水平($P < 0.0001$)和肝TG水平($P < 0.05$)显著升高,肝HDL-C水平显著降低($P < 0.001$),表现出增重和脂质代谢异常。毛菊苣乙醇提取物能显著降低小鼠体重($P < 0.0001$)、血清TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.01$)水平及肝TG($P < 0.0001$)、LDL-C($P < 0.05$)水平。方法学验证结果表明本研究建立的方法能准确定量粪便中的52种胆汁酸。分析各类胆汁酸浓度发现,毛菊苣乙醇提取物能显著增大次级胆汁酸/初级胆汁酸比例($P < 0.05$)。多元统计分析结果显示,各组的胆汁酸代谢模式发生明显改变。以第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) > 1 , $P < 0.05$ 为条件筛选出给药组相对模型组的8种差异胆汁酸。通过检索京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库,发现差异胆汁酸主要参与次级胆汁酸生物合成途径。相关分析表明,粪便中脱氧胆酸($r_s = 0.6445$, $P < 0.001$)、异石胆酸($r_s = 0.5879$, $P < 0.01$)、3 β -脱氧胆酸($r_s = 0.6649$, $P < 0.001$)和 ω -鼠胆酸($r_s = 0.5387$, $P < 0.01$)4种差异胆汁酸与体重具有较强的正相关。**结论** 毛菊苣乙醇提取物可能通过调控次级胆汁酸生物合成,改变粪便胆汁酸代谢轮廓从而发挥减重和改善脂质异常的作用。

【关键词】 毛菊苣;肥胖;胆汁酸;代谢组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1122-17

Effect of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profile in obese mice based on targeted metabolomics technique

QI Shuwen, ZHONG Yewei, ADALAITI Abudurexiti, ZHANG Rui, HOU Wenhui,
ZHANG Chunzi, MA Xiaoyan, MA Xiaoli*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: MA Xiaoli. E-mail: xiaoli_Ma@xjmu.edu.cn

【基金项目】 新疆维吾尔自治区天山英才青年拔尖人才项目(2022TSYCCX0104)。

Funded by Tianshan Top Talents Youth Elites Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region(2022TSYCCX0104)。

【作者简介】 祁淑雯,女,硕士,研究方向:抗糖尿病新药研发。Email: qsw9999@163.com

【通信作者】 马晓丽,女,教授,博士,研究方向:抗糖尿病新药研发。Email: xiaoli_Ma@xjmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effect of ethanolic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profiles in high-fat-diet-induced obese mice. **Methods** Twenty-four 6-week-old C57 BL/6 male mice were divided randomly into normal, model, drug-administration, and metformin groups. Mice in the normal group were fed a regular diet and mice in the other three groups were given high-fat diets. The drug-administration group was gavaged with 10 mL/kg ethanol extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. daily, and the metformin group was gavaged with 10 mL/kg metformin daily. After 10 weeks, livers were collected to measure hepatic total triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein (HDL)-C. Feces were collected and analyzed. **Results** Body weight ($P < 0.0001$), liver TG ($P < 0.05$), and TC ($P > 0.05$) were all significantly higher in model mice compared with normal mice, while LDL-C ($P > 0.05$) and HDL-C ($P < 0.001$) were significantly lower, indicating abnormal weight gain and lipid metabolism. Alcoholic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. significantly reduced body weight ($P < 0.0001$), liver TG ($P < 0.0001$), serum TG ($P < 0.05$), TC ($P < 0.01$), and LDL-C ($P < 0.05$) in mice. Methodsological validation showed that the current method could accurately quantify 52 bile acids in feces. Analysis of the concentration of each type of bile acid revealed that alcoholic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. significantly increased the secondary/primary bile acid ratio ($P < 0.05$). Multivariate analysis showed that the bile acid metabolic pattern was significantly altered in all groups. Eight differential bile acids were screened in the drug-administration group relative to the model group using variable importance of projection > 1 and $P < 0.05$. A search of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database revealed that the differential bile acids were mainly involved in the secondary bile acid biosynthesis pathway. Correlation analysis showed that four differential bile acids, deoxycholic acid ($r_s = 0.6445$, $P < 0.001$), isolithocholic acid ($r_s = 0.5879$, $P < 0.01$), 3 β -deoxycholic acid ($r_s = 0.6649$, $P < 0.001$), and ω -rhamnoglutaric acid ($r_s = 0.5387$, $P < 0.01$), in feces were strongly positively correlated with body weight. **Conclusions** *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. alcoholic extract may play a role in weight reduction and amelioration of dyslipidemia by modulating secondary bile acid biosynthesis and altering fecal bile acid metabolic profiles.

[Keywords] *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.; obesity; bile acids; metabolomics

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

毛菊苣为菊科植物毛菊苣 (*Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.) 的干燥地上部分或根,是新疆地区特有的天然药物资源。毛菊苣作为菊苣来源之一收载于 2020 版中国药典第一部,具有清肝利胆的功效^[1-2]。现代药理研究表明,毛菊苣主要成分包括多糖类、酚酸类、黄酮类、萜类、苯丙素类等,具有保肝,降糖降脂的功效^[3-4]。课题组前期研究显示,毛菊苣乙醇提取物具有改善糖尿病 db/db 小鼠的脂质代谢紊乱的功能,能显著降低血清熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)和 α -鼠胆酸(α -muricholic acid, α -MCA)水平,并与血清甘油三酯(triglycerides, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)水平呈正相关^[5],因此推测毛菊苣可能通过调节胆汁酸(bile acids, BAs)代谢发挥减脂作用。目前尚无毛菊苣对肥胖动物模型胆汁酸代谢影响的报道。

胆汁酸是胆固醇经肝代谢生成的一种两亲性类固醇分子,通过调节体内的胆汁酸受体从而影响机体能量代谢和糖脂稳态,可作为识别肝疾病和代谢紊乱的一类潜在生物标志物^[6],已有文献报道,胆汁酸作为生物标志物在肥胖发病和进展过程中起到重要作用^[7-8]。目前,靶向代谢组学广泛应用

于揭示肥胖状态下的体内代谢物变化,发现药物的潜在分子靶标。如茯苓乙醇提取物通过调控尿液中的氨基酸水平改善大鼠脂质代谢紊乱^[9],JI 等^[10]确定了黄连汤剂治疗高脂诱导大鼠肥胖作用与血清和盲肠中的关键代谢标志物水平相关。但目前肥胖相关的粪便胆汁酸代谢研究较少,因此进行粪便胆汁酸代谢组学研究对丰富当前肥胖机制研究具有重要意义。

基于此,本研究建立高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠肥胖模型,给予毛菊苣乙醇提取物干预,通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)靶向代谢组学技术,对小鼠粪便中的 52 种胆汁酸进行定量分析。通过多元分析筛选出差异胆汁酸,探究毛菊苣作用于脂质异常的胆汁酸调节通路,为毛菊苣改善肥胖小鼠脂质代谢紊乱的可能机制提供线索,拓展其药理应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只,体重

(20 ± 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】, 于新疆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房【SYXK(新)2023-0004】饲养, 恒定室温(25 ± 1) °C, 相对湿度 55% ~ 65%, 每日光暗周期 12 h/12 h, 可自由活动、进食与饮水。本研究所有实验方案均得到新疆医科大学动物伦理委员会的批准(IACUC-20220720-08), 符合实验室动物与使用准则。

1.1.2 药物

毛菊苣购于新疆和田市墨玉县, 经新疆医科大学药学院徐海燕教授鉴定为菊科菊苣属植物毛菊苣的全草, 阴干后保存在新疆医科大学药学院。

1.1.3 主要试剂与仪器

甲醇、乙腈和乙酸铵为 LC-MS 级(德国 CNW Technologies); 二甲双胍(默克制药(江苏)有限公司, ACF2938); 戊巴比妥钠; TG 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A110-1-1); TC 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A111-1-1); 低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A113-1-1); 高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A112-1-1)。Vanquish 超高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific)、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、Heraeus Fresco17 离心机均购自美国赛默飞世尔科技公司; Waters ACQUITY UPLC BEH C18 液相色谱柱(Waters, 150×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$); BSA124S-CW 天平(德国赛多利斯); YM-080S 超声仪(深圳方奥微电子有限公司); JXFSTPRP-24 研磨仪(上海净信科技有限公司); 明澈 D24 UV 纯水仪(德国默克密理博)。

1.2 方法

1.2.1 毛菊苣乙醇提取物的制备

取干燥的毛菊苣全草, 在 80 °C 下用乙醇回流 60 min, 料液比约为 1:10, 过滤, 浓缩, 干燥。

1.2.2 动物分组及样本采集

24 只 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为正常组、模型组、给药组和二甲双胍组, 每组 6 只。正常组给予普通饲料和水, 以 1% 吐温 80 灌胃; 模型组、给药组和二甲双胍组给予高脂饲料和水, 其中给药组以 10 mL/kg 体积灌胃毛菊苣乙醇提取物溶液(以 200 mg 毛菊苣乙醇提取物加入 10 mL 1% 吐温 80 的比例, 超声溶解, 制备成浓度为

20 mg/mL 的毛菊苣乙醇提取物溶液), 二甲双胍组每日以 10 mL/kg 的体积灌胃二甲双胍溶液(以 100 mg 二甲双胍加入 10 mL 1% 吐温 80 的比例, 超声溶解, 制备成浓度为 20 mg/mL 的二甲双胍溶液)灌胃。小鼠喂养 10 周后, 处理前 1 d 收集粪便。禁食不禁水 12 h 后, 小鼠经 70 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后, 眼眶取血, 血液室温放置 1 h 后, 3500 r/min、4 °C 离心 10 min 得到血清。脱颈处死后, 收集肝组织, 将其迅速冷冻在液氮中, 并于 -80 °C 冰箱中储存。

1.2.3 血清及肝生化指标检测

按照试剂盒说明书检测血清及肝 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量。

1.2.4 肝组织病理学检测

通过苏木素-伊红(HE)染色法观察各组小鼠肝组织病理形态变化: 经 4% 多聚甲醛固定后的肝组织, 经清洗、透明、包埋、切片、染色、封片, 镜下观察肝组织病理形态。

1.2.5 粪便胆汁酸提取

称取 25 mg 粪便加入 1000 μL 提取液(甲醇: 乙腈: 水 = 2:2:1, 含内标, -40 °C 预冷), 涡旋混匀 30 s; 加入钢珠, 35 Hz 研磨处理 4 min, 超声 5 min(冰水浴); 重复 3 次上一步骤; -40 °C 静置 1 h; 样品 4 °C, 12 000 r/min, 半径 8.6 cm, 离心 15 min; 取上清液至 LC 进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.6 标准溶液配制

准确称取相应量的标准品于容量瓶中, 分别配制成 1 mg/mL 的标准品储备液。取相应量的标准品储备液于容量瓶中, 配制成混合标准溶液。依次稀释该标准溶液得一系列校准溶液。

1.2.7 UPLC-MS/MS 法检测粪便胆汁酸含量

(1) 色谱条件: 采用 Vanquish 超高效液相色谱仪, 通过 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (150×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$, Waters) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为 5 mmol/L 的乙酸铵水溶液, B 相为乙腈, 洗脱条件: 0 ~ 8.5 min 20% B; 8.5 ~ 15 min 20% → 26% B; 15 ~ 18.5 min 26% → 46% B; 18.5 ~ 20 min 46% → 99% B; 20 ~ 23 min 99% B; 23 ~ 23.4 min 99% → 20% B; 23.4 ~ 27 min 20% B。流速为 0.3 mL/min, 柱温为 45 °C, 进样体积为 1 μL 。

(2) 质谱条件: 使用 Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪, 以平行反应监测(parallel reaction

monitoring, PRM) 模式进行质谱分析。离子源参数如下:喷雾电压 + 3500/-3200 V,鞘气(N_2)流量 40 arb,辅助气(N_2)流量 15 arb,辅助加热器温度 350 °C,毛细管温度 320 °C。

(3) 方法学考察

线性:对“1.2.6”得到的系列校准溶液进行 UPLC-MS/MS 分析。Y 表示目标胆汁酸与内标的峰面积比, X 表示目标胆汁酸的浓度,采用最小二乘法进行回归分析,权重设为 $1/X$ 。

检出限和定量限:将校准溶液稀释 2 倍后进行 UPLC-MS/MS 分析。将信噪比为 3 时所对应的胆汁酸浓度定义为检出限(limit of detection, LOD),将信噪比为 10 时所对应的胆汁酸浓度定义为定量限(limit of quantitation, LOQ)。

精密度:通过 QC 样品重复进样 7 次的峰面积标准相对偏差(relative standard deviation, RSD)评价。

准确度:通过加标回收率(recovery rate)即 QC 样品测得浓度与加标浓度的百分比值评价。

1.2.8 数据处理

利用 TraceFinder 4.10 软件对质谱数据进行采集和处理。对原始数据中的缺失值,以最小值与 0.1 至 0.5 范围内的随机数相乘进行填补。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 对药效学数据进行 ANOVA 方差分析,正态性检验;采用学生 t 检验(Student's t test)对代谢组学数据进行单变量统计分析, $P < 0.05$ 认为组间差异具有显著性。胆汁酸浓度数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SIMCA 16.0.2 对数据进行多元统计分析,包括主成分分析(principal components analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal projections to latent structures discriminant analysis, OPLS-DA)。以第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)大于 1, $P < 0.05$ 为标准筛选差异胆汁酸。使用 GraphPad Prism 8.3 进行相关性分析。利用 R 绘制层次聚类分析热图。

2 结果

2.1 毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠体重、血清及肝 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的影响

第 10 周对小鼠进行称重,与正常组相比,模型组小鼠体重显著增加($P < 0.0001$),给予毛菊苣乙

醇提取物和二甲双胍能有效逆转高脂饮食诱导的体重上升($P < 0.0001$)。检测各组小鼠血清及肝 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平,结果显示与正常组相比,模型组血清 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.0001$),HDL-C 水平无显著性差异,肝 TG 水平显著升高($P < 0.05$),TC 和 LDL-C 水平无显著性差异,HDL-C 水平显著降低($P < 0.001$);与模型组相比,给药组能显著降低血清 TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.01$)水平及肝 TG($P < 0.0001$)、LDL-C($P < 0.05$)水平,血清 HDL-C 及肝 TC 和 HDL-C 水平无显著性差异,二甲双胍能显著降低血清 TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.05$)和肝 TG($P < 0.0001$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.05$)水平,不改变 HDL-C 水平,见图 1。

2.2 毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝组织病理形态的影响

正常组肝组织中肝细胞形态正常,排列紧密、肝索较清晰;模型组肝细胞变性肥大,胞浆疏松明显、不可见清晰肝索,并出现小脂肪空泡;与模型组相比,给药组和二甲双胍组肝组织病变减轻,肝细胞形态基本正常,见图 2。

2.3 UPLC-MS/MS 的胆汁酸识别与定量

对各组小鼠粪便样本进行分析,已有标准品的 52 种 BAs,根据标准品的保留时间及定量离子和特征离子的精确质量数 $m/z \pm 10$ ppm 进行识别和定量,见图 3、4。表明采用本分析方法可得到较好的色谱峰,很好地实现了各胆汁酸的色谱分离。

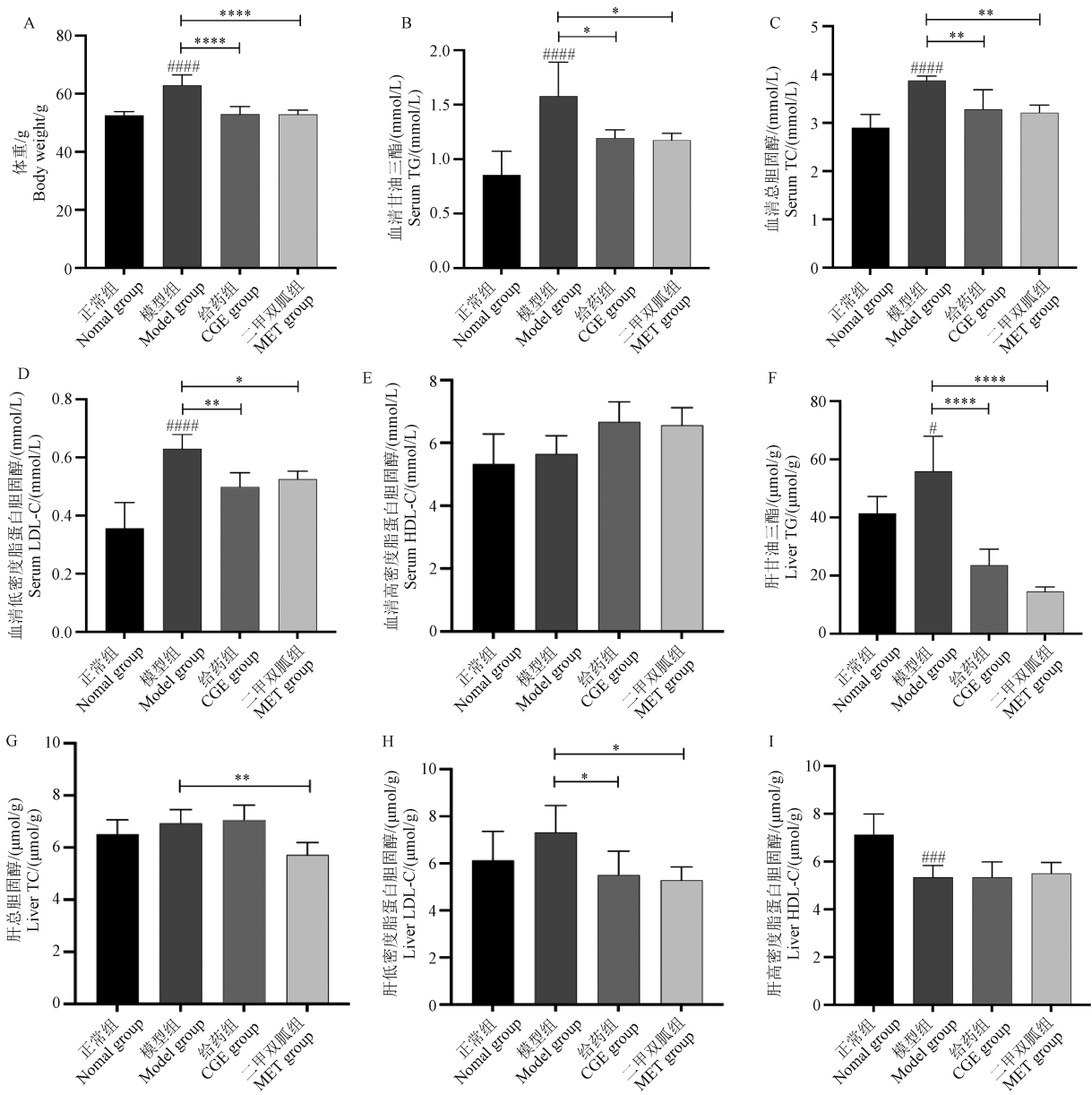
2.4 方法学考察

52 种胆汁酸标准品的 $R^2 > 0.9940$; LOD 在 0.43 ~ 7.14 nmol/L, LOQ 在 0.85 ~ 4.29 nmol/L; Recovery 在 81.3% ~ 100.0%, RSD $< 4.3\%$ 。表明本方法具有较好的线性,精密度和准确度较高,能够准确可靠的检出粪便样品中的胆汁酸。结果见表 1。

2.5 各组胆汁酸定量结果

本研究采用 UPLC-MS/MS 法,通过 BA 的标准曲线,对三组小鼠中粪便中的 52 种已知 BAs 进行了准确定量,结果采用浓度(nmol/g)表示,见表 2。

给予高脂饮食后,总粪便胆汁酸含量显著升高($P < 0.0001$),而毛菊苣乙醇提取物和二甲双胍能显著降低总粪便胆汁酸水平($P < 0.05$)。较于正常组,模型组 DHCA 和 UDCA-3S 水平降低($P <$



注:A:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠的体重影响($n = 10$);B:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 TG 的影响($n = 6$);C:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 TC 的影响($n = 6$);D:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 LDL-C 的影响($n = 6$);E:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 HDL-C 的影响($n = 6$);F:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 TG 的影响($n = 6$);G:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 TC 的影响($n = 6$);H:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 LDL-C 的影响($n = 6$);I:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 HDL-C 的影响($n = 6$)。与正常组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$;与模型组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 1 毛菊苣乙醇提取物对各组小鼠体重、血清及肝 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 的影响

Note. A. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on the body weight of obese mice ($n = 10$). B. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum triglycerides (TG) in obese mice ($n = 6$). C. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum total cholesterol (TC) in obese mice ($n = 6$). D. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in obese mice ($n = 6$). E. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in obese mice ($n = 6$). F. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver TG in obese mice ($n = 6$). G. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver TC in obese mice ($n = 6$). H. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver LDL-C in obese mice ($n = 6$). I. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver HDL-C in obese mice ($n = 6$). Compared with normal group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$. Compared with model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Effects of *C. glandulosum* ethanol extract on body weight, serum and liver TC, TG, LDL-C and HDL-C in obese mice

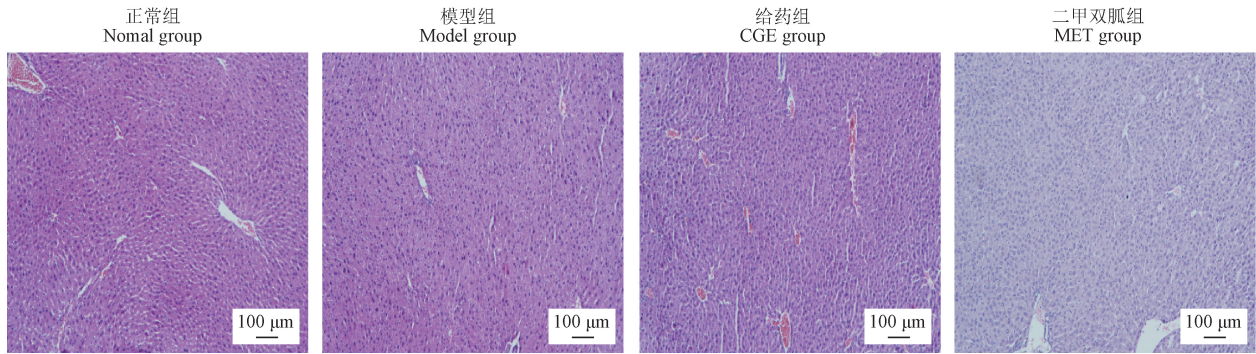


图 2 毛菊苣乙醇提取物对肝组织形态的影响(HE 染色)

Figure 2 Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on the histomorphology of liver (HE staining)

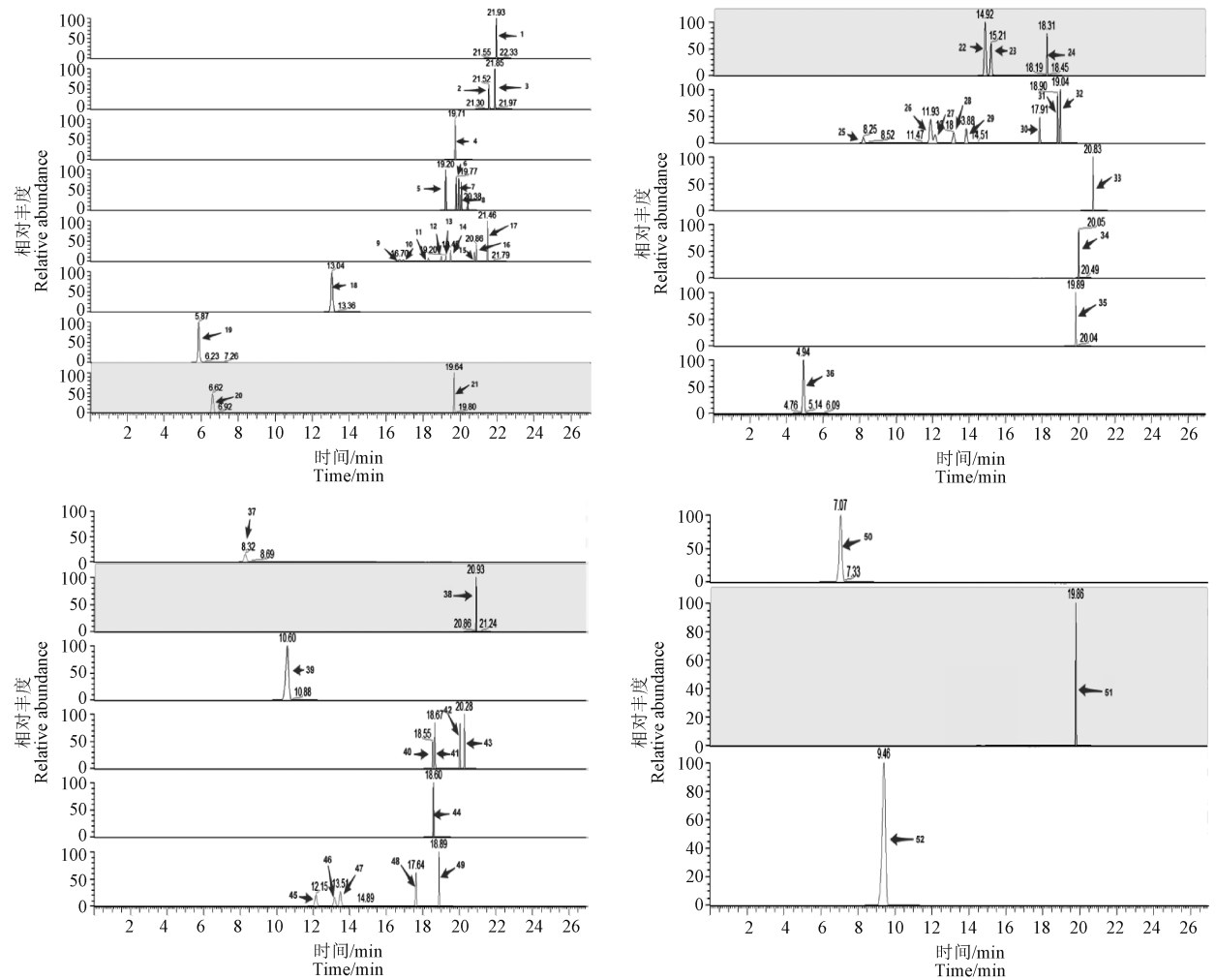


图 3 标准品溶液的提取离子色谱图

Figure 3 Ion chromatograms of standard solutions and sample extracts

0.05), isoLCA、 ω -MCA、isoHDCA、MDCA、THDCA、GLCA、T- ω -MCA、HDCA、3 β -DCA、DCA、DHCA、 α -MCA、HCA、isoUDCA、THCA、6-ketoLCA、GCDCA-3Gln、apoCA、UDCA-3S、TCA、TUDCA、CA-3S、T- α -MCA、CDCA-24Gln、T- β -MCA 和 12-ketoLCA 的水平升高($P < 0.05$);相较于模型组,给药组能逆转其中 isoLCA、3 β -DCA、DCA、 ω -MCA、CA-3S 和 GCDCA-3Gln 6 种胆汁酸的水平($P < 0.05$),同时升高 LCA 和 23-norDCA 水平($P < 0.05$)。二甲双胍组能逆转模型组 isoLCA、isoUDCA、MDCA、3 β -DCA、DCA 和

表 1 方法学考察结果

Table 1 Results of methodological study

胆汁酸 Bile acids	线性方程 Regression equation	决定系数 R^2	检出限/ (nmol/L) LOD/ (nmol/L)	定量限/ (nmol/L) LOQ/ (nmol/L)	标准相 对偏差 RSD	回收率/% Recovery/%
脱氢石胆酸 Dehydrolithocholic acid	$Y = 0.0061X + 0.0059$	0.9993	1.66	3.31	0.6	89.9
异石胆酸 Isolithocholic acid	$Y = 0.0073X + 0.0073$	0.9988	1.69	3.38	0.7	87.0
石胆酸 Lithocholic acid	$Y = 0.0038X + 0.0032$	0.9995	0.87	1.74	0.9	86.3
23-脱甲脱氧胆酸 23-nordeoxycholic acid	$Y = 0.0075X + 0.0002$	0.9998	1.65	3.29	3.5	82.7
6-酮石胆酸 6-ketolithocholic acid	$Y = 0.0049X + 0.0014$	0.9999	0.97	1.94	1.3	90.8
7-酮基石胆酸 7-ketolithocholic acid	$Y = 0.0039X - 0.0002$	0.9999	0.93	1.85	2.5	83.2
12-酮基石胆酸 12-ketolithocholic acid	$Y = 0.0057X + 0.0115$	0.9998	0.43	0.85	2.7	82.2
原胆酸 Apocholic acid	$Y = 0.0028X + 0.0019$	0.9981	1.96	3.92	0.9	84.0
异熊去氧胆酸 Isoursodeoxycholic acid	$Y = 0.0063X + 0.0092$	0.9992	3.34	6.68	1.1	82.3
鼠脱氧胆酸 Murideoxycholic acid	$Y = 0.0064X + 0.0078$	0.9996	1.62	3.24	1.5	85.4
异猪去氧胆酸 Isohyodeoxycholic acid	$Y = 0.0066X + 0.0037$	0.9996	1.92	3.83	1.7	81.3
熊脱氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	$Y = 0.0044X + 0.0066$	0.9996	0.94	1.88	1.7	85.7
猪脱氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	$Y = 0.0182X + 0.0180$	0.9990	1.77	3.53	1.8	86.0
3 β -脱氧胆酸 3 β -deoxycholic acid	$Y = 0.0043X + 0.0236$	0.9998	0.83	1.67	3.0	85.3
鹅脱氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	$Y = 0.0071X + 0.0054$	0.9998	1.10	2.19	1.1	86.6
脱氧胆酸 Deoxycholic acid	$Y = 0.0020X + 0.0026$	0.9999	0.88	1.75	1.4	85.6
异脱氧胆酸 Isodeoxycholic acid	$Y = 0.0033X + 0.0005$	0.9995	1.13	2.27	0.8	82.4
去甲胆酸 Nor cholic acid	$Y = 0.0072X + 0.0240$	0.9993	0.85	1.70	1.3	82.2
脱氢胆酸 Dehydrocholic acid	$Y = 0.0081X - 0.0007$	0.9987	1.61	3.23	0.8	91.8
7,12-二酮石胆酸 7,12-diketolithocholic acid	$Y = 0.0122X + 0.0018$	0.9988	0.94	1.88	3.3	85.8
6,7-二酮石胆酸 6,7-diketolithocholic acid	$Y = 0.0048X + 0.0032$	0.9994	3.41	6.81	3.9	84.9
7-酮脱氧胆酸 7-ketodeoxycholic acid	$Y = 0.0054X + 0.0107$	0.9993	3.91	7.82	1.4	82.6
12-脱氢胆酸 12-dehydrocholic acid	$Y = 0.0042X + 0.0117$	0.9993	3.53	7.07	1.2	82.0
3-脱氢胆酸 3-dehydrocholic acid	$Y = 0.0024X + 0.0011$	0.9991	3.52	7.05	3.8	90.0
熊果胆酸 Ursocholic acid	$Y = 0.0060X + 0.0273$	0.9997	0.49	0.97	2.4	87.0

续表 1

胆汁酸 Bile acids	线性方程 Regression equation	决定系数 R^2	检出限/ (nmol/L) LOD/ (nmol/L)	定量限/ (nmol/L) LOQ/ (nmol/L)	标准相 对偏差 RSD	回收率/% Recovery/%
3β-胆酸 3β-cholic acid	Y = 0.0041X + 0.0039	0.9983	1.65	3.29	1.6	87.7
ω-鼠胆酸 ω-muricholic acid	Y = 0.0030X + 0.0076	0.9995	1.73	3.46	4.3	85.3
α-鼠胆酸 α-muricholic acid	Y = 0.0036X + 0.0144	0.9999	0.89	1.77	1.4	83.5
β-鼠胆酸 β-muricholic acid	Y = 0.0039X + 0.0012	0.9995	0.85	1.69	0.8	87.3
猪胆酸 Hyocholic acid	Y = 0.0061X + 0.0107	0.9995	7.14	14.29	1.0	85.3
别胆酸 Allochoic acid	Y = 0.0056X + 0.0009	0.9998	0.44	0.87	3.5	84.1
胆酸 Cholic acid	Y = 0.0025X + 0.0120	0.9998	3.55	7.11	1.5	81.5
甘氨石胆酸 Glycolithocholic acid	Y = 0.0028X + 0.0046	0.9999	0.45	0.91	1.0	89.5
石胆酸-3-硫酸 Lithocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0042X - 0.0000	0.9999	0.49	0.99	3.6	84.2
甘氨脱氢胆酸 Glycodehydrocholic acid	Y = 0.0031X + 0.0032	0.9978	3.28	6.55	1.0	100.0
熊去氧胆酸-3-硫酸 Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	Y = 0.0033X + 0.0035	0.9996	0.88	1.76	3.0	84.2
牛磺石胆酸 Taurolithocholic acid	Y = 0.0085X + 0.0053	0.9997	0.89	1.79	1.2	87.2
3-硫酸胆酸 Cholic acid-3-sulfate	Y = 0.0013X + 0.0013	0.9995	0.51	1.03	1.1	81.4
牛磺熊脱氧胆酸 Tauroursodeoxycholic acid	Y = 0.0063X - 0.0007	0.9999	2.07	4.15	1.4	87.5
牛磺猪脱氧胆酸 Taurohyodeoxycholic acid	Y = 0.0034X - 0.0009	0.9993	6.90	13.80	1.4	88.6
牛磺鹅脱氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	Y = 0.0024X + 0.0250	0.9987	1.62	3.24	1.3	83.3
牛磺脱氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	Y = 0.0061X + 0.0367	0.9989	6.65	13.31	1.6	85.4
甘氨石胆酸-3-硫酸 Glycolithocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0080X + 0.0066	0.9997	1.69	3.38	1.0	87.5
牛磺-ω-鼠胆酸 Tauro-ω-muricholic acid	Y = 0.0061X + 0.0059	0.9997	0.43	0.86	1.3	88.9
牛磺-α-鼠胆酸 Tauro-α-muricholic acid	Y = 0.0073X + 0.0073	0.9988	0.84	1.68	3.3	92.8
牛磺-β-鼠胆酸 Tauro-β-muricholic acid	Y = 0.0038X + 0.0032	0.9993	0.90	1.80	0.7	89.7
牛磺猪胆酸 Taurohyocholic acid	Y = 0.0075X + 0.0002	0.9999	1.05	2.09	0.8	81.7
牛磺胆酸 Taurocholic acid	Y = 0.0049X + 0.0014	0.9999	0.86	1.71	1.5	81.5
甘氨胆酸-3-硫酸 Glycocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0063X + 0.0092	0.9988	6.48	12.95	1.4	86.0
鹅去氧胆酸-24-酰基-β-葡糖苷酸 Chenodeoxycholic acid-24-acyl-β-D-glucuronide	Y = 0.0044X + 0.0066	0.9995	3.87	7.75	3.5	89.3
甘氨鹅脱氧胆酸-3-O-β-葡糖醛酸 Glycochenodeoxycholic acid-3-O-β-glucuronide	Y = 0.0072X + 0.0240	0.9989	1.59	3.18	2.1	84.8
甘氨脱氧胆酸 Glycdeoxycholic acid	Y = 0.0031X + 0.0067	0.9991	3.36	6.71	1.5	83.6

表 2 52 种胆汁酸定量结果(nmol/g, n = 6)

Table 2 Quantitative results of 52 bile acids(nmol/g, n = 6)

胆汁酸 Bile acids	缩写 Abbreviations	正常组 Normal group	模型组 Model group	给药组 CGE group	二甲双胍组 MET group
ω-鼠胆酸 ω-muricholic acid	ω-MCA	393. 10 ± 177. 43	2841. 94 ± 931. 18 [#]	1625. 99 ± 703. 76 [*]	22. 11 ± 10. 98
脱氧胆酸 Deoxycholic acid	DCA	228. 76 ± 128. 02	1518. 51 ± 185. 98 ^{####}	995. 97 ± 336. 80 [*]	56. 51 ± 26. 20 [*]
12-酮基石胆酸 12-ketolithocholic acid	12-ketoLCA	161. 98 ± 63. 64	283. 72 ± 91. 81 [#]	388. 19 ± 133. 40	0. 76 ± 0. 41
3-硫酸胆酸 Cholic acid-3-sulfate	CA-3S	149. 17 ± 202. 59	1656. 11 ± 669. 98 [#]	601. 80 ± 328. 22 [*]	0. 15 ± 0. 20 [*]
β-鼠胆酸 β-muricholic acid	β-MCA	146. 02 ± 44. 37	635. 37 ± 534. 38	351. 36 ± 60. 07	124. 63 ± 115. 31
α-鼠胆酸 α-muricholic acid	α-MCA	43. 67 ± 18. 96	174. 06 ± 70. 59 [#]	124. 15 ± 53. 09	1794. 61 ± 1420. 15
猪脱氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	HDCA	22. 85 ± 12. 48	123. 46 ± 69. 91 [#]	134. 68 ± 61. 16	2. 36 ± 1. 29
牛磺胆酸 Taurocholic acid	TCA	22. 56 ± 7. 32	41. 42 ± 9. 61 [#]	38. 82 ± 7. 31	0. 16 ± 0. 06
胆酸 Cholic acid	CA	17. 21 ± 5. 81	30. 30 ± 20. 87	40. 18 ± 21. 35	3. 05 ± 1. 25
脱氢石胆酸 Dehydrolithocholic acid	DHLCA	15. 67 ± 9. 24	19. 19 ± 7. 37	28. 45 ± 15. 79	19. 62 ± 9. 29
牛磺-β-鼠胆酸 Tauro-β-muricholic acid	T-β-MCA	14. 65 ± 5. 52	36. 28 ± 17. 89 [#]	22. 08 ± 6. 89	3. 74 ± 0. 54
鹅脱氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	CDCA	12. 58 ± 9. 93	74. 90 ± 58. 05	73. 27 ± 16. 71	39. 00 ± 35. 39
3β-胆酸 3β-cholic acid	3β-CA	10. 49 ± 3. 93	116. 69 ± 124. 24	36. 37 ± 11. 25	0. 11 ± 0. 27
12-脱氢胆酸 12-dehydrocholic acid	12-DHCA	9. 89 ± 3. 73	18. 01 ± 8. 24	22. 90 ± 8. 77	9. 26 ± 3. 06
3β-脱氧胆酸 3β-deoxycholic acid	3β-DCA	8. 32 ± 5. 35	77. 30 ± 10. 15 ^{####}	41. 25 ± 19. 59 [*]	96. 27 ± 53. 53 [*]
原胆酸 Apocholic acid	CA	6. 81 ± 5. 07	40. 76 ± 20. 05 [#]	29. 98 ± 9. 43	225. 03 ± 61. 76
别胆酸 Allocholic acid	ACA	6. 43 ± 3. 75	9. 21 ± 10. 38	17. 79 ± 19. 97	15. 91 ± 12. 29
7-酮脱氧胆酸 7-ketodeoxycholic acid	7-KDCA	5. 37 ± 1. 86	8. 93 ± 4. 17	12. 86 ± 2. 50	0. 71 ± 0. 21
6-酮石胆酸 6-ketolithocholic acid	6-ketoLCA	4. 38 ± 3. 31	18. 72 ± 7. 13 [#]	34. 11 ± 22. 67	0. 55 ± 0. 27
牛磺-ω-鼠胆酸 Tauro-ω-muricholic acid	T-ω-MCA	4. 36 ± 1. 32	19. 17 ± 9. 06 [#]	10. 91 ± 4. 07	0. 07 ± 0. 09
异石胆酸 Isolithocholic acid	isoLCA	3. 73 ± 1. 28	27. 21 ± 5. 92 ^{##}	16. 96 ± 5. 34 [*]	0. 08 ± 0. 04 [*]
异猪去氧胆酸 Isohyodeoxycholic acid	isoHDCA	3. 36 ± 1. 97	29. 29 ± 11. 26 [#]	19. 63 ± 8. 79	7. 03 ± 2. 58
猪胆酸 Hyocholic acid	HCA	3. 21 ± 1. 84	14. 95 ± 5. 04 [#]	11. 06 ± 4. 25	235. 25 ± 100. 42
牛磺-α-鼠胆酸 Tauro-α-muricholic acid	T-α-MCA	3. 10 ± 1. 20	6. 47 ± 2. 49 [#]	4. 13 ± 1. 16	10. 29 ± 4. 47
甘氨酸-3-硫酸 Glycocholic acid-3-sulfate	GCA-3S	2. 95 ± 2. 01	0. 79 ± 1. 14	1. 42 ± 1. 20	31. 27 ± 9. 26
鼠脱氧胆酸 Murideoxycholic acid	MDCA	2. 70 ± 0. 72	13. 63 ± 6. 16 [#]	10. 50 ± 3. 04	2. 45 ± 0. 99 [*]
牛磺鹅脱氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	TCDCA	2. 45 ± 0. 89	2. 30 ± 0. 37	1. 75 ± 0. 43	1. 98 ± 0. 66 [*]
牛磺脱氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	TDCA	2. 41 ± 0. 92	5. 76 ± 3. 22	3. 68 ± 1. 43	1. 51 ± 0. 43

续表 2

胆汁酸 Bile acids	缩写 Abbreviations	正常组 Normal group	模型组 Model group	给药组 CGE group	二甲双胍组 MET group
7-酮基石胆酸 7-ketolithocholic acid	7-ketoLCA	1.64 ± 1.08	1.25 ± 1.48	1.33 ± 0.47	16.30 ± 4.97
熊脱氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	UDCA	1.51 ± 1.175	7.75 ± 7.60	6.07 ± 2.11	15.18 ± 11.23
牛磺熊脱氧胆酸 Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA	1.47 ± 0.61	4.44 ± 1.85 [#]	4.00 ± 1.61	867.06 ± 400.22
3-脱氢胆酸 3-dehydrocholic acid	3-DHCA	1.35 ± 0.44	1.51 ± 0.93	1.97 ± 0.79	14.90 ± 4.79
鹅去氧胆酸-24-酰基-β-葡萄糖苷酸 Chenodeoxycholic acid-24-acyl-β-D-glucuronide	CDCA-24Gln	1.21 ± 0.26	1.56 ± 0.12 [#]	1.64 ± 0.15	0.48 ± 0.62
6,7-二酮石胆酸 6,7-diketolithocholic acid	6,7-diketoLCA	1.06 ± 0.49	1.05 ± 0.68	0.64 ± 0.15	0.54 ± 0.52
异熊去氧胆酸 Isoursodeoxycholic acid	isoUDCA	0.99 ± 0.64	7.15 ± 3.90 [#]	4.84 ± 1.88	20.72 ± 9.56 [*]
甘氨酸脱氢胆酸 Glycodehydrocholic acid	GDHCA	0.97 ± 0.56	0.57 ± 0.21	0.38 ± 0.18	0.03 ± 0.04
去甲胆酸 Nor cholic acid	NCA	0.96 ± 1.22	0.82 ± 0.48	0.63 ± 0.62	0.00 ± 0.00
熊果胆酸 Ursocholic acid	UCA	0.84 ± 0.40	2.68 ± 2.32	3.09 ± 2.07	1.28 ± 0.25
7,12-二酮石胆酸 7,12-diketolithocholic acid	7,12-diketoLCA	0.63 ± 0.37	0.23 ± 0.07	1.02 ± 0.79	0.11 ± 0.19
牛磺猪脱氧胆酸 Taurohyodeoxycholic acid	THDCA	0.59 ± 0.24	2.94 ± 1.20 [#]	2.70 ± 1.32	3.24 ± 0.77
熊去氧胆酸硫酸 Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	UDCA-3S	0.36 ± 0.20	0.10 ± 0.04 [#]	0.09 ± 0.03	0.30 ± 0.12
23-脱甲脱氧胆酸 23-nordeoxycholic acid	23-norDCA	0.18 ± 0.17	0.28 ± 0.13	0.77 ± 0.36 [*]	106.10 ± 34.42
脱氢胆酸 Dehydrocholic acid	DHCA	0.12 ± 0.10	0.00 ± 0.00 [#]	0.10 ± 0.11	0.37 ± 0.44
石胆酸-3-硫酸 Lithocholic acid-3-sulfate	LCA-3S	0.10 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.05
牛磺石胆酸 Tauro lithocholic acid	TLCA	0.07 ± 0.08	0.16 ± 0.12	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.04
甘氨酸石胆酸-3-硫酸 Glycolithocholic acid-3-sulfate	GLCA-3S	0.06 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.12 ± 0.05	3.80 ± 2.76
甘氨酸胆酸 Glycolithocholic acid	GLCA	0.05 ± 0.01	0.18 ± 0.07 [#]	0.17 ± 0.08	14.69 ± 4.25
异脱氧胆酸 Isodeoxycholic acid	isoDCA	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.03	780.36 ± 475.90 [*]
甘氨酸鹅脱氧胆酸-3-O-β-葡萄糖醛酸 Glycochenodeoxycholic acid-3-O-β-glucuronide	GCDCA-3Gln	0.02 ± 0.04	0.15 ± 0.05 [#]	0.06 ± 0.04 [*]	1.54 ± 0.18 [*]
石胆酸 Lithocholic acid	LCA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	135.83 ± 33.22 ^{**}	12.36 ± 5.12 ^{**}
牛磺猪胆酸 Taurohyocholic acid	THCA	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.05 [#]	0.13 ± 0.15	20.59 ± 4.41 [*]
甘氨酸脱氧胆酸 Glycodeoxycholic acid	GDCA	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.28 ± 0.07 [*]
总胆汁酸 Total bile acids	—	1322.41	7877.70 ^{####}	4816.44 [*]	4584.79 [*]

注:与正常组相比, ^{##}*P* < 0.01。(下图同)
Note. Compared with the normal group, ^{##}*P* < 0.01. (The same in the following figures)

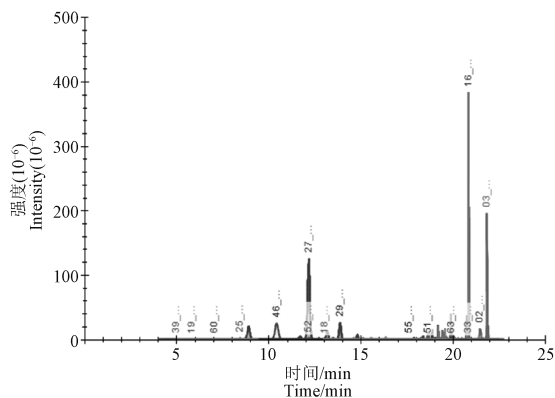
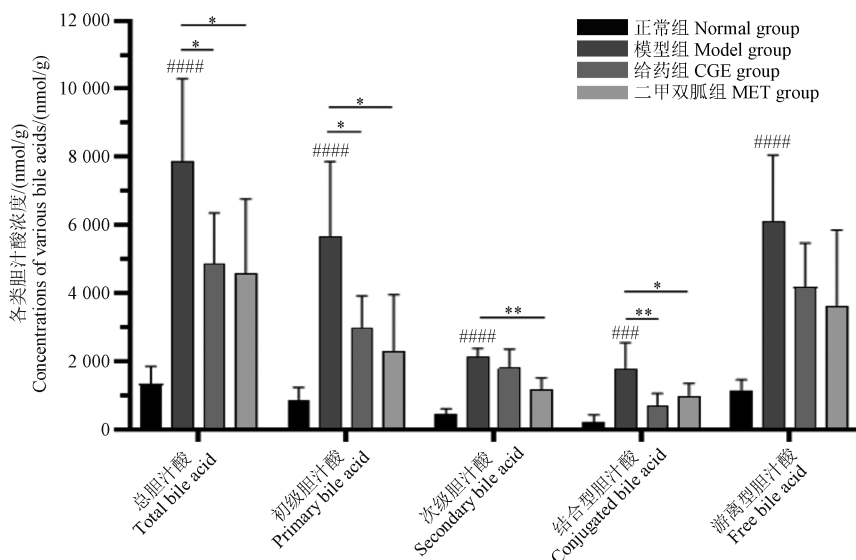


图 4 样品提取离子色谱图

Figure 4 Extracted ion chromatograms of the sample

图 5 各组不同类型胆汁酸浓度(nmol/g, $n = 6$)Figure 5 Different bile acid concentrations in each group(nmol/g, $n = 6$)

胆汁酸($P < 0.01$),游离型胆汁酸有下降趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。

各组次级胆汁酸/初级胆汁酸比值见图 6,与正常组相比,模型组该比值下降但无统计学意义($P > 0.05$),与模型组相比,给药组该比值显著升高($P < 0.05$),二甲双胍组该比值升高,但无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 多元统计分析-胆汁酸代谢轮廓分析

本研究采用 PCA 对正常组、模型组、给药组和二甲双胍组 4 组小鼠的粪便胆汁酸代谢轮廓进行分析,采用 OPLS-DA 对 4 组进行两两比较,并对 4 组胆汁酸浓度进行层次聚类分析。

2.6.1 PCA 分析

PCA 得分散点图中可以看出,样本全部处于 95%置信区间。如图 7 正常组和模型组的散点呈现

CA-3S 6 种胆汁酸水平($P < 0.05$),此外还降低 isoDCA、GDHCA、TCDCA 水平($P < 0.05$),升高 LCA 和 THCA 水平($P < 0.05$)。

各组不同类型胆汁酸浓度结果见图 5,与正常组相比,模型组初级胆汁酸($P < 0.0001$)、次级胆汁酸($P < 0.0001$)、结合型胆汁酸($P < 0.001$)和游离性胆汁酸($P < 0.0001$)浓度均升高;给予毛菊苣乙醇提取物能显著降低模型组升高的初级胆汁酸($P < 0.05$)和结合型胆汁酸($P < 0.01$),次级胆汁酸和游离性胆汁酸有下降的趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。给予二甲双胍能降低模型组升高的初级胆汁酸($P < 0.05$)、次级胆汁酸($P < 0.01$)和结合型

明显的分离,说明给予高脂饮食致使小鼠粪便胆汁酸组成发生变化;给药组与模型组散点呈分离的趋势,并同二甲双胍组散点聚集在一定区域内,说明给予毛菊苣乙醇提取物后,小鼠粪便胆汁酸组成相较模型组发生变化。

2.6.2 OPLS-DA 分析

如图 8 OPLS-DA 得分散点图中,正常组和模型组,给药组和模型组,二甲双胍组和模型组的散点均明显分离,同时每组内散点的聚集程度较好。表明正常组和模型组,给药组和模型组,二甲双胍组和模型组之间的粪便胆汁酸组成均存在差异。通过置换检验验证 OPLS-DA 模型拟合效果,Q2 的回归线在纵坐标上的截距小于 0,表明此模型无过度拟合现象,具有较好的可预测性和拟合度,可准确地描述数据。

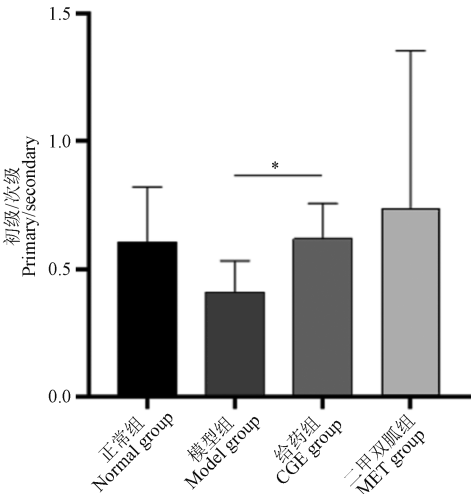


图 6 各组次级胆汁酸/初级胆汁酸的比值($n = 6$)
Figure 6 Ratio of secondary bile acids/primary bile acids in each group ($n = 6$)

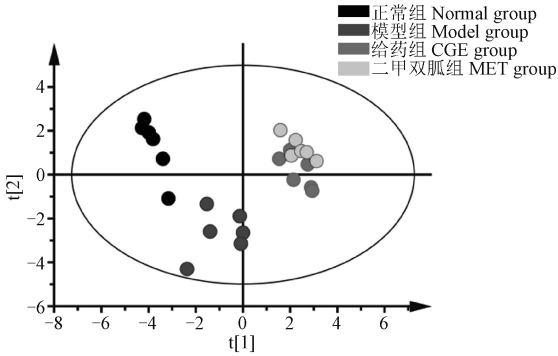


图 7 PCA 得分散点图
Figure 7 Score scatter plot of PCA model

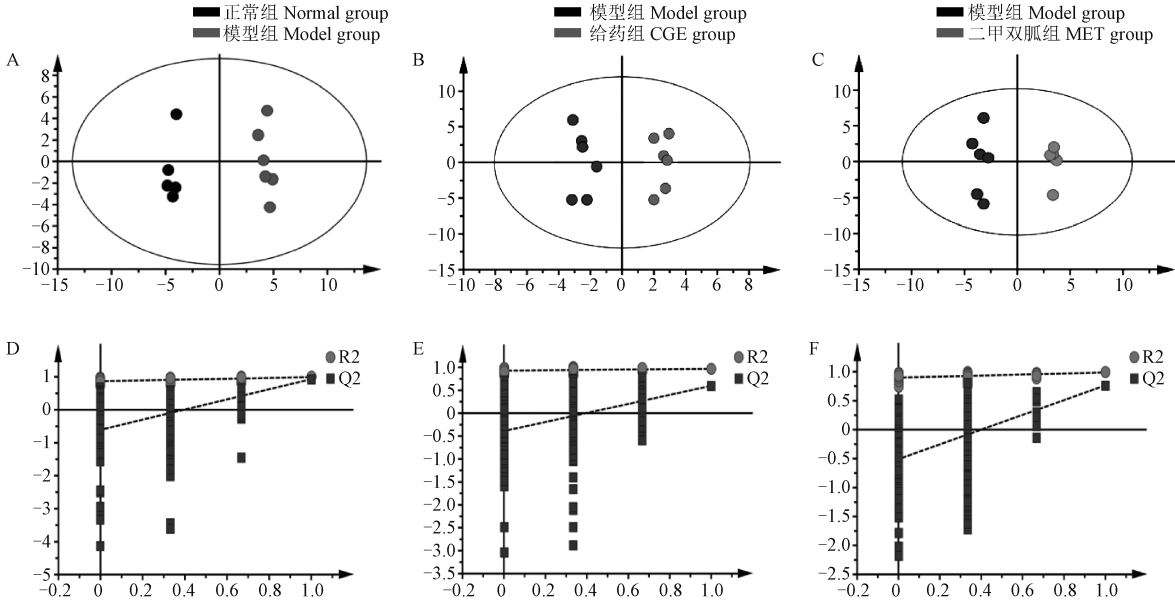
32 种胆汁酸,二甲双胍组上调了 9 种胆汁酸,下调了 43 种胆汁酸。

2.7 差异胆汁酸筛选

以 $VIP > 1, P < 0.05$ 为筛选条件,从 52 种胆汁酸中筛选出各组之间的差异胆汁酸,结果见表 3。相对于正常组,模型组有 22 种胆汁酸水平显著变化;相对于模型组,给药组显著升高 LCA ($P < 0.001$) 和 23-norDCA ($P < 0.05$) 水平,显著降低 DCA、 3β -DCA、isoLCA、CA-3S、 ω -MCA、GDCA-3Gln

2.6.3 层析聚类分析

对 4 组胆汁酸浓度数据进行层次聚类分析,并绘制热图,结果如图 9。相较于正常组,模型组上调了 42 种胆汁酸,下调 10 种胆汁酸;相较于模型组,毛菊苣乙醇提取物组上调了 20 种胆汁酸,下调了



注:A:正常组对模型组 OPLS-DA 得分散点图;B:给药组对模型组的 OPLS-DA 得分散点图;C:二甲双胍组对模型组的 OPLS-DA 得分散点图;D:正常组对模型组的置换检验结果;E:给药组对模型组的置换检验结果;F:二甲双胍组对模型组的置换检验结果。

图 8 OPLS-DA 得分散点图和置换检验结果

Note. A. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the normal group to the model group. B. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the treated group to the model group. C. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the metformin group to the model group. D. Permutation test results comparing the normal group to the model group. E. Permutation test results comparing the treated group to the model group. F. Permutation test results comparing the metformin group to the model group.

Figure 8 Score scatter plot of OPLS-DA model and permutation test

表 3 差异胆汁酸

Table 3 Differential bile acid profile

胆汁酸 Bile acid	模型组 VS 正常组 Model group VS Normal group		给药组 VS 模型组 CGE group VS Model group		二甲双胍组 VS 模型组 MET group VS Model group		KEGG 编号 KEGG ID	代谢通路 Metabolic pathways
	P 值 P value	VIP 值 VIP value	P 值 P value	VIP 值 VIP value	P 值 P value	VIP 值 VIP value		
isoLCA	0.000 ↑	1.489	1.705 ↓	0.017	1.527 ↓	0.001	—	—
ω-MCA	0.002 ↑	1.487	1.533 ↓	0.042	—	—	C17727	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
isoHDCA	0.003 ↑	1.480	—	—	—	—	—	—
MDCA	0.010 ↑	1.452	—	—	1.224 ↓	0.049	C15515	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
THDCA	0.007 ↑	1.441	—	—	—	—	—	—
TLCA	0.011 ↑	1.425	—	—	—	—	—	—
T-ω-MCA	0.014 ↑	1.385	—	—	—	—	—	—
α-MCA	0.008 ↑	1.381	—	—	—	—	—	—
HDCA	0.005 ↑	1.381	—	—	—	—	—	—
isoUDCA	0.016 ↑	1.362	—	—	1.409 ↓	0.043	C17662	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
THCA	0.024 ↑	1.359	—	—	1.139 ↑	0.032	C15516	—
6-ketoLCA	0.002 ↑	1.340	—	—	—	—	—	—
GDCA-3Gln	0.002 ↑	1.332	1.516 ↓	0.013	—	—	—	—
CA	0.012 ↑	1.313	—	—	—	—	—	—
UDCA-3S	0.028 ↓	1.270	—	—	—	—	—	—
TCA	0.006 ↑	1.248	—	—	—	—	—	—
TUDCA	0.014 ↑	1.220	—	—	—	—	—	—
CA-3S	0.003 ↑	1.213	1.583 ↓	0.010	1.086 ↓	0.043	—	—
T-α-MCA	0.021 ↑	1.073	—	—	—	—	—	—
CDCA-24Gln	0.022 ↑	1.044	—	—	—	—	—	—
T-β-MCA	0.042 ↑	1.044	—	—	—	—	—	—
12-ketoLCA	0.035 ↑	1.024	—	—	—	—	—	—
23-norDCA	—	—	1.391 ↑	0.027	—	—	—	—
LCA	—	—	2.187 ↑	0.000	1.890 ↑	0.001	C03990	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
DCA	—	—	1.780 ↓	0.013	1.338 ↓	0.006	C04483	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
3β-DCA	—	—	1.881 ↓	0.004	1.355 ↓	0.045	C20865	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
isoDCA	—	—	—	—	1.504 ↓	0.030	C17661	—
TCDCA	—	—	—	—	1.503 ↓	0.009	C05465	初级胆汁酸生物合成和 次级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis and secondary bile acid biosynthesis
GDHCA	—	—	—	—	1.255 ↓	0.030	—	—

注：↑：含量上升；↓：含量下降。
Note. ↑. Rise of content. ↓. Decline of content.

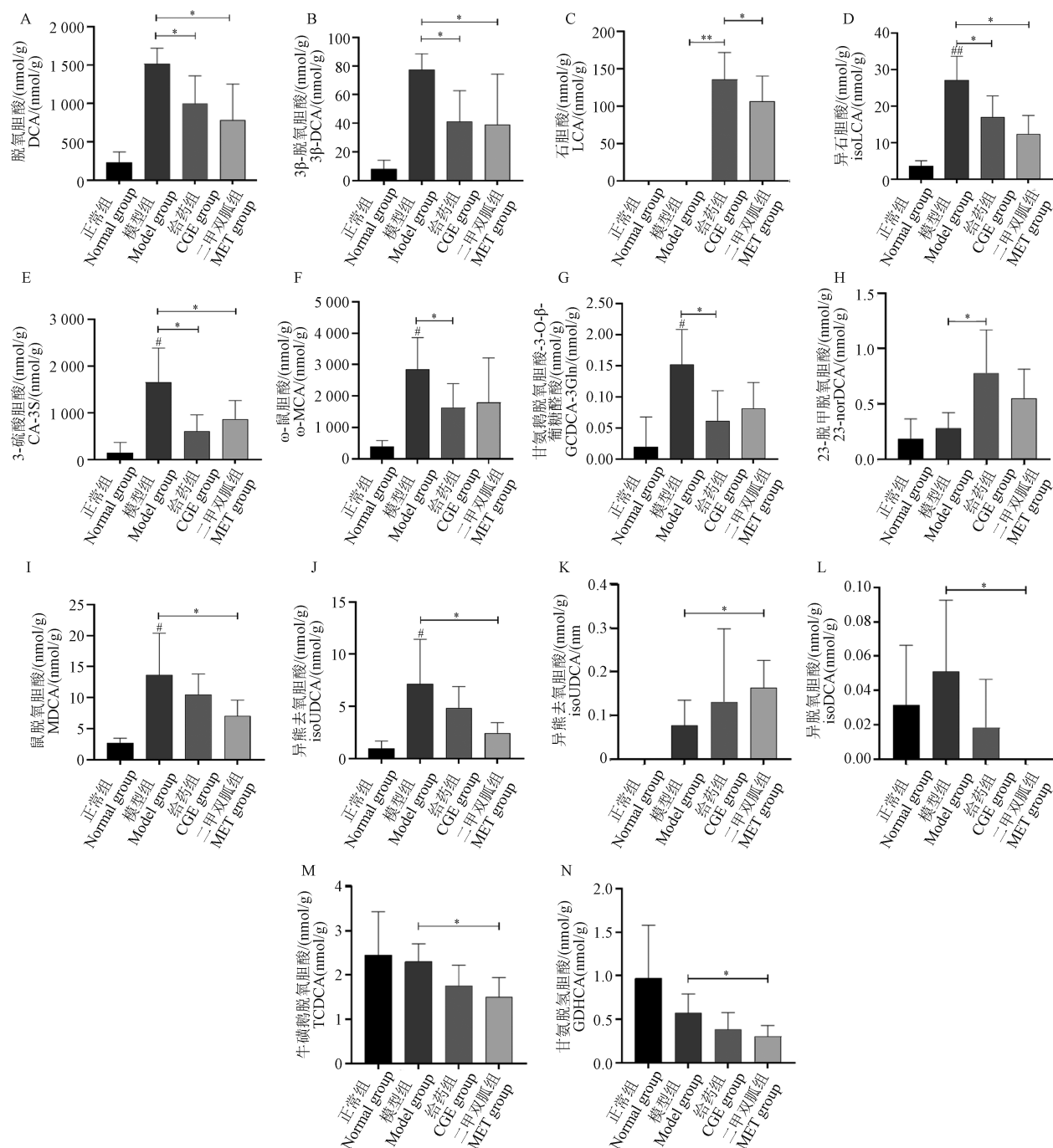
胆汁酸水平 ($P < 0.05$)；二甲双胍组显著升高 THCA 和 LCA 水平 ($P < 0.05$)，显著降低 isoLCA、MDCA、isoUDCA、CA-3S、DCA、3β-DCA、isoDCA、TCDCA 和 GDHCA 水平 ($P < 0.05$)。给药组和二甲双胍组与模型组之间的差异胆汁酸如图 10。

通过 KEGG 数据库检索给药组相对于模型组、二甲双胍组相对于模型组的差异胆汁酸参与的生物代谢途径，结果见表 3，发现给药组的差异胆汁酸主要参与次级胆汁酸生物合成代谢途径，二甲双胍

表 4 小鼠体重和粪便差异胆汁酸的相关性分析 ($n = 24$)

Table 4 Correlation analysis of body weight and fecal differential bile acids in mice ($n = 24$)

差异胆汁酸 Differential bile acids	Spearman 相关系数 r_s	P 值 P value
LCA	-0.2837	0.1792
DCA	0.6445	0.0007
isoLCA	0.5879	0.0025
23-norDCA	-0.0890	0.6792
3β-DCA	0.6649	0.0004
ω-MCA	0.5387	0.0066
CA-3S	-0.3153	0.1334
GCDCA-3Gln	0.5692	0.0037



注:A:脱氧胆酸浓度;B:3 β -脱氧胆酸浓度;C:石胆酸浓度;D:异石胆酸浓度;E:3-硫酸胆酸浓度;F: ω -鼠胆酸浓度;G:甘氨酸鹅脱氧胆酸-3-O- β -葡萄糖醛酸浓度;H:23-脱甲脱氧胆酸浓度;I:鼠脱氧胆酸浓度;J:异熊去氧胆酸浓度;K:牛磺猪胆酸浓度;L:异脱氧胆酸浓度;M:牛磺鹅脱氧胆酸浓度;N:甘氨酸脱氧胆酸浓度。

图 10 不同组之间的差异胆汁酸 (nmol/g, $n = 6$)

Note. A. Deoxycholic acid concentration. B. 3 β -deoxycholic acid concentration. C. Lithocholic acid concentration. D. Isolithocholic acid concentration. E. 3-sulfate cholic acid concentration. F. ω -muricholic acid concentration. G. Glycoursodeoxycholic acid-3-O- β -glucuronide concentration. H. 23-Nor-deoxycholic acid concentration. I. Murideoxycholic acid concentration. J. Isooursodeoxycholic acid concentration. K. Taurohyodeoxycholic acid concentration. L. Isoodeoxycholic acid concentration. M. Tauro-ursodeoxycholic acid concentration. N. Glycorydeoxycholic acid concentration.

Figure 10 Differences between groups bile acids (nmol/g, $n = 6$)

便胆汁酸总含量显著回调,提示毛菊苣乙醇提取物

可改善胆汁酸代谢来调节脂质异常堆积。对初级、

次级、结合型和游离型胆汁酸水平进行分析发现,相较于正常组,模型组各类粪便胆汁酸水平均升高;相较于模型组毛菊苣乙醇提取物能显著降低粪便中初级胆汁酸和结合型胆汁酸水平,次级胆汁酸和游离性胆汁酸水平呈下降趋势。胆汁酸的主要生理作用是促进脂质的乳化和吸收,同时还作为信号分子激活体内两种主要的感受器:核受体 FXR 和细胞表面受体 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1)^[16]。因此胆汁酸是机体调节糖脂代谢相关复杂通路的关键因子,维持体内胆汁酸种类和水平的平衡对代谢性疾病至关重要。本研究中毛菊苣乙醇提取物还显著升高了粪便中次级/初级胆汁酸比值。相较于初级胆汁酸,次级胆汁酸因更低的溶解性而更难被重吸收,可导致机体更多的胆固醇排泄。研究表明,在高脂饮食喂养的小鼠肝脂肪变性中,伴随的次级胆汁酸及次级胆汁酸产生菌-乳酸杆菌科和钩端螺旋杆菌科的增加,有利于缓解代谢异常^[17]。柑橘总黄酮可通过增加小鼠拟杆菌科的相对丰度升高次级胆汁酸与初级胆汁酸的比例,显著减轻非酒精性脂肪肝小鼠的 FXR 和 TGR5 缺乏^[18]。本研究中粪便总胆汁酸和初级胆汁酸降低,而次级/初级胆汁酸比例增加,表明毛菊苣乙醇提取物可能通过增加次级胆汁酸产生菌丰度,促进了初级胆汁酸进入肠道后向次级胆汁酸转化的过程。

通过多元统计分析和差异胆汁酸筛选,鉴别出给药组相对于模型组的 8 种差异胆汁酸:LCA 和 23-norDCA 水平显著升高,DCA、3 β -DCA、isoLCA、CA-3S、 ω -MCA 和 GCDCA-3Gln 水平显著降低,其中多种胆汁酸被证明具有一系列的生物活性,可能在毛菊苣乙醇提取物调节脂质异常的过程中可能发挥着关键作用。如 DCA 和 LCA 都与肥胖相关疾病关系密切。DCA 水平与食欲调节和能量代谢相关酶,如胃肠激素、胰高血糖素样肽-1 等活性有关^[19]。先前研究表明高脂饮食喂养可增加大鼠血液,结肠和粪便中的 DCA 水平,高水平 DCA 会损伤肝星状细胞 DNA,并导致肥胖相关的肝细胞癌,而降低 DCA 水平可有效阻止肥胖小鼠的肝细胞癌进展^[20]。本研究结果中模型组粪便 DCA 水平显著增加,给予毛菊苣乙醇提取物会逆转这种现象。LCA 具有强疏水性而被认为具有肝毒性,但最近的研究表明,LCA 和 UDCA 混合物可通过激活 FXR 通路和修复肠道屏障完整性来降低高脂血症^[21-22]。本研

究中毛菊苣乙醇提取物升高了肥胖小鼠的粪便 LCA 含量,表明其可能促进肠道中 LCA 产生。鉴于这些差异胆汁酸的重要生物活性,本研究继续在 KEGG 数据库中检索了粪便差异胆汁酸参与的代谢通路,发现给药组相对于模型组的差异胆汁酸主要调节次级胆汁酸生物合成路径,进一步印证了毛菊苣乙醇提取物能促进肠道中初级胆汁酸向次级胆汁酸转化的推测。Spearman 相关性分析发现粪便中 DCA、isoDCA、3 β -DCA 和 ω -MCA 4 种胆汁酸与体重具有较强的正相关性,表明毛菊苣乙醇提取物发挥减重作用可能与降低差异胆汁酸水平作用密切相关。研究表明,DCA 在迟缓真杆菌和产气荚膜梭菌作用下,经 3 β 羟基差向异构化产生 isoDCA,DCA 转变为 isoDCA 有利于拟杆菌属生长,而拟杆菌属被证明在小鼠模型中能够起到预防肥胖的作用^[23-24]。 ω -MCA 由小鼠体内主要的初级胆汁酸 β -MCA 经 6 β -差向异构化形成。有文献表明给予西方饮食小鼠补充低聚果糖,可增加盲肠和门静脉中的次级胆汁酸水平(主要是 6 α -羟基胆汁酸,如 ω -MCA、HCA 和 HDCA),改善糖代谢、减少增重^[25]。3 β -DCA 则是 DCA 的 3 β 差向异构体。胆汁酸在肠道中的代谢与肠道菌群组成变化有关,因此推测毛菊苣乙醇提取物可能通过影响相关肠菌丰度来发挥减重作用。

综上所述,本研究通过代谢组学技术鉴别出 8 种差异粪便胆汁酸,主要涉及次级胆汁酸生物合成途径。毛菊苣可能通过调节次级胆汁酸生物合成,改变胆汁酸代谢轮廓,发挥减重和调控脂质代谢紊乱的作用,这为后续毛菊苣的药理机制研究提供可靠的理论基础。课题组未来将在本研究的基础上,结合血清样本的胆汁酸代谢组学研究,进一步探讨毛菊苣对肥胖小鼠肠道菌群的影响,阐明毛菊苣对次级胆汁酸生物合成的调控作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] 新疆部队后勤部卫生部. 新疆中草药手册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社; 1970.
Xinjiang Army Logistics Department Health Department. Xinjiang herbal medicine manual [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House; 1970.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press; 2020.
- [3] PEROVIĆ J, ŠAPONJAC V T, KOJIĆ J, et al. Chicory

- (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient-nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: a review [J]. Food Chem, 2021, 336: 127676.
- [4] YANG J, LEI Y, YAN J, et al. Research progress on the homologous effects of *Cichorium glandulosum* boiss. et huet on medicine and food: a review [J]. Nat Prod Commun, 2024, 19(4): 1–19.
- [5] YAN J, ZHANG R, KANG J, et al. Effect of *Cichorium glandulosum* on intestinal microbiota and bile acid metabolism in db/db mice [J]. Food Sci Nutr, 2023, 11(12): 7765–7778.
- [6] BATHENA S P, THAKARE R, GAUTAM N, et al. Urinary bile acids as biomarkers for liver diseases I. Stability of the baseline profile in healthy subjects [J]. Toxicol Sci, 2015, 143(2): 296–307.
- [7] LI R, ANDREU-SÁNCHEZ S, KUIPERS F, et al. Gut microbiome and bile acids in obesity-related diseases [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2021, 35(3): 101493.
- [8] MOLINARO A, WAHLSTRÖM A, MARSCHALL H U. Role of bile acids in metabolic control [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(1): 31–41.
- [9] 赵辉. 基于 UPLC-HDMS 的代谢组学研究茯苓和茯苓皮抗高脂血症大鼠的生物化学作用机制 [D]. 西安: 西北大学; 2020.
- ZHAO H. Metabonomics study based on UPLC-HDMS on the biochemical mechanism of *Poria cocos* and *Poria cocos* peel against hyperlipidemia in rats [D]. Xi'an: Northwest University; 2020.
- [10] JI Y, LUO K, ZHANG J M, et al. Obese rats intervened with *Rhizoma coptidis* revealed differential gene expression and microbiota by serum metabolomics [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 208.
- [11] YEREVANIAN A, SOUKAS A A. Metformin: mechanisms in human obesity and weight loss [J]. Curr Obes Rep, 2019, 8(2): 156–164.
- [12] ZHANG Y, CHENG Y, LIU J, et al. Tauroursodeoxycholic acid functions as a critical effector mediating insulin sensitization of metformin in obese mice [J]. Redox Biol, 2022, 57: 102481.
- [13] SUN L, XIE C, WANG G, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin [J]. Nat Med, 2018, 24(12): 1919–1929.
- [14] DI CIAULA A, GARRUTI G, LUNARDI BACCETTO R, et al. Bile acid physiology [J]. Ann Hepatol, 2017, 16(105): S4-S14.
- [15] WATANABE M, HORAI Y, HOUTEN S M, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure [J]. J Biol Chem, 2011, 286(30): 26913–26920.
- [16] RIDLON J M, HARRIS S C, BHOWMIK S, et al. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria [J]. Gut Microbes, 2016, 7(1): 22–39.
- [17] ZENG H, LARSON K J, CHENG W H, et al. Advanced liver steatosis accompanies an increase in hepatic inflammation, colonic, secondary bile acids and lactobacillaceae/lachnospiraceae bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet [J]. J Nutr Biochem, 2020, 78: 108336.
- [18] HE B, JIANG J, SHI Z, et al. Pure total flavonoids from *Citrus* attenuate non-alcoholic steatohepatitis via regulating the gut microbiota and bile acid metabolism in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 135: 111183.
- [19] ROBERTS R E, GLICKSMAN C, ALAGHBAND-ZADEH J, et al. The relationship between postprandial bile acid concentration, GLP-1, PYY and ghrelin [J]. Clin Endocrinol, 2011, 74(1): 67–72.
- [20] LIN H, AN Y, TANG H, et al. Alterations of bile acids and gut microbiota in obesity induced by high fat diet in rat model [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(13): 3624–3632.
- [21] HAN Z, YAO L, ZHONG Y, et al. Gut microbiota mediates the effects of curcumin on enhancing Ucp1-dependent thermogenesis and improving high-fat diet-induced obesity [J]. Food Funct, 2021, 12(14): 6558–6575.
- [22] HUI S, HUANG L, WANG X, et al. Capsaicin improves glucose homeostasis by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion through the regulation of bile acid metabolism via the remodeling of the gut microbiota in male mice [J]. FASEB J, 2020, 34(6): 8558–8573.
- [23] DEVLIN A S, FISCHBACH M A. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11: 685–690.
- [24] WU L, PARK S H, KIM H. Direct and indirect evidence of effects of *Bacteroides* spp. on obesity and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2023, 25(1): 438.
- [25] MAKKI K, BROLIN H, PETERSEN N, et al. 6 α -hydroxylated bile acids mediate TGR5 signalling to improve glucose metabolism upon dietary fiber supplementation in mice [J]. Gut, 2023, 72(2): 314–324.

[收稿日期] 2023-12-20