

BP 神经网络算法结合超高效液相色谱-质谱联用技术研究红花治疗慢性酒精性肝损伤的作用机制

王曦焯¹, 韩晓静², 姜明洋³, 白梅荣², 许良¹

(1. 内蒙古民族大学化学与材料学院, 天然产物化学与功能分子合成自治区重点实验室, 内蒙古 通辽 028000;

2. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 蒙医药研发工程教育部重点实验室, 内蒙古 通辽 028000;

3. 内蒙古民族大学计算机科学与技术学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 临床上, 红花对慢性酒精性肝损伤(chronic alcoholic liver injury, CALI)有很好的疗效, 但治疗机制不甚明确。因此, 阐明红花治疗 CALI 的分子作用机制对药物的进一步开发及应用具有重要意义。以雄性 Wistar 大鼠为研究对象, 模型组大鼠以 8 mL/kg 酒精连续灌胃 28 天, 建立 CALI 模型; 给药组大鼠分别以高(4.290 3 g/kg)、中(1.430 1 g/kg)、低(0.476 7 g/kg)剂量灌胃红花提取物。采用大鼠血清代谢组学分析方法结合超高效液相色谱-质谱技术鉴定与 CALI 相关的潜在生物标志物, 并研究红花对这些生物标志物的调控机制。利用 MATLAB 软件建立 BP 神经网络模型处理组学数据的分类问题。从苏木精和伊红(H&E)染色实验发现, 高剂量红花提取物减轻了肝细胞的损伤程度; 与模型组相比, 高剂量红花组中的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)的表达水平降低, 表明高剂量红花提取物具有肝保护作用。BP 神经网络模型分类准确率为 95.8%, 分类效果良好。通过火山图分析共鉴定出 20 种与 CALI 相关的生物标志物, 红花可以对这些生物标志物产生回调效果。研究表明, 红花可能通过对甘油三酯、脂肪酸、磷脂、胆汁酸、氨基酸、维生素 E 代谢的调控作用而对 CALI 产生治疗效果。本研究可为红花的推广和临床应用提供了理论基础。

关键词: 红花; 慢性酒精性肝损伤; 代谢组学; 超高效液相色谱-质谱(UHPLC-MS); BP 神经网络算法

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2024)06-0897-10

DOI: 10.7538/zpxb.2024.1004

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.1004

Study on the Mechanism of *Flos Carthami* Treatment for Chronic Alcoholic Liver Injury Using BP Neural Network Algorithm Combined with UHPLC-MS Technology

WANG Xi-ye¹, HAN Xiao-jing², JIANG Ming-yang³, BAI Mei-rong², XU Liang¹

(1. Inner Mongolia Key Laboratory for the Natural Products Chemistry and Functional Molecular Synthesis, College of Chemistry and Materials Science, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China;

2. Key Laboratory of Mongolian Research and Development Project in Ministry of Education, Mongolian Medical College, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China;

3. College of Computer Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China)

国家自然科学基金地区项目(82260844, 62162049); 内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划(NJYT23136); 内蒙古自治区直属高校基本科研业务费项目(GXKY22118); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划(NMGIRT2216); 内蒙古自然科学基金(2021MS08072); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY21430); 蒙医药研发工程教育部重点实验室开放基金(MDK2021041); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划项目(NMGIRT2417)

本文通信作者白梅荣, 许良

Abstract: *Flos Carthami* (FC) has a good therapeutic effect on chronic alcoholic liver injury (CALI) in clinical practice, but the treatment mechanism is not very clear. Therefore, elucidating the molecular mechanism of action of FC in treating CALI is of great significance for the further development and application of drugs. Male Wistar rats were as the research object. The model group rats were orally administered with 8 mL/kg alcohol for 28 days to establish a CALI model, while the treatment group rats were orally administered with high (4.290 3 g/kg), medium (1.430 1 g/kg), and low (0.476 7 g/kg) doses of FC extract. Potential biomarkers related to CALI were identified using rat serum metabonomics analysis methods combined with ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry (UHPLC-MS) technology, and the regulatory mechanisms of FC on these biomarkers were investigated. The BP neural network model was established by MATLAB software to deal with the classification problem of omics data. The H&E staining experiment found that after gavage, high-dose FC extract can reduce the degree of liver cell damage. Compared with the model group, the expression levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the high-dose FC group decrease, indicating that the high-dose FC extract has liver protective effect. The classification accuracy of the BP neural network model is 95.8%, and the classification effect is good. Through volcanic map analysis, a total of twenty biomarkers related to CALI are identified, and FC can have a callback effect on these biomarkers. The results indicated that FC may exert therapeutic effect on CALI by regulating the metabolism of triglycerides, fatty acids, phospholipids, bile acids, amino acids and Vitamin E. This study provides a theoretical foundation for the promotion and clinical application.

Key words: *Flos Carthami*; chronic alcoholic liver injury (CALI); metabonomics; ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry (UHPLC-MS); BP neural network algorithm

慢性酒精性肝损伤(chronic alcoholic liver injury, CALI)是一种与长期大量饮酒相关的肝病。CALI可导致脂肪肝、肝炎、肝纤维化和肝硬化,其主要临床表现为黄疸、肝脏肿大和上消化道出血,严重酒精中毒会导致肝细胞坏死和肝衰竭^[1]。在我国, CALI是一种流行病,发病率和死亡率都很高。糖皮质激素可以改善 CALI引起的严重酒精性肝病患者的预后^[2];美他多辛可以加速酒精从血清中清除,并有助于改善酒精中毒和异常行为的症状^[3];多烯磷脂酰胆碱对肝细胞膜和细胞器有抗氧化、抗炎和保护作用,并可在临床上改善肝脏生化指标^[4]。虽然它们对 CALI 有疗效,但每种药物都有不同程度的副作用,这在一定程度上限制了临床应用。

红花(*Flos Carthami*, FC)常用于活血化瘀,治疗心脑血管疾病。近年来,人们发现 FC 对肝损伤有保护作用^[5]。羟基红花黄色素 A(HSYA)是红花的代表性生物活性成分,是一种具有良好药用价值的天然色素,有着广泛、有效的药理活性。HSYA 已被证明具有心血管效应、肝和肺保护、

神经保护、抗肿瘤活性、代谢调节和内皮细胞保护等生物学效应^[6]。研究发现, HSYA 能够通过调节 α -平滑肌肌动蛋白(SMA)、I型胶原 α 、基质金属蛋白酶(MMP)-9和金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-1的表达而抑制大鼠肝纤维化^[7]。此外, HSYA 预处理小鼠在阶段性肝缺血后血清转氨酶水平、炎症和坏死、炎性细胞因子表达和巨噬细胞募集均降低。这些结果表明, HSYA 可以通过在炎症条件下直接减弱巨噬细胞活化来减少肝脏损伤^[8]。然而,关于红花治疗 CALI 的分子机制研究则鲜见报道。

目前,代谢组学数据分类主要通过主成分分析(principal component analysis, PCA)完成,其是一种无监督学习的降维算法,利用正交变换对一系列可能线性相关的变量进行转换,然后利用变换后得到的主成分变量在更小的维度下展示数据,PCA 完成数据降维和聚类后,依据数据原有类别完成分类^[9]。但是,PCA 在数据处理过程中往往会丢失大量原始数据,如果前几个主成分的累积贡献率低,则该模型不合格,利用该模型获

得的分类准确度也会降低。BP(back propagation)神经网络是1986年由Rumelhart和McClelland等提出的概念,作为一种按照误差逆向传播算法训练的多层前馈神经网络,其是应用最广泛的神经网络模型之一^[10]。BP神经网络算法依据目标输出,在训练过程通过误差逆向传播算法不断修正网络结构中连接神经元的权值,网络的输出即为降维的结果,通过与数据标签值相比完成数据的分类。相比于PCA,BP神经网络具有较好的非线性数据拟合能力和适应性,由于代谢组学数据具有高维、稀疏、样本数量少、多噪声等特点,BP神经网络可以更好地提高分类准确率^[11]。

本文将建立大鼠CALI模型,并应用BP神经网络算法和超高效液相色谱-质谱(UHPLC-MS)联用技术研究红花治疗CALI的作用机制。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Dionex Ultimate 3000超高效液相色谱仪、Q-Exactive Focus Orbitrap质谱仪:美国Thermo Fisher Scientific公司产品;Waters Acquity UPLC BEH C18柱(1.7 μm ×2.1 mm×50 mm):美国Waters公司产品。

1.2 药品与试剂

红花:购自通辽泽强药店,由内蒙古民族大学化学与材料学院许良教授鉴定。红花以10倍量水浸泡30 min,并于60 $^{\circ}\text{C}$ 提取3次,每次30 min,合并滤液,回收,65 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩,冷冻干燥获得提取物。56%乙醇:北京牛栏山有限公司产品;甲醇、甲酸:赛默飞世尔(中国)科技有限公司产品;丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒:罗氏诊断有限公司(瑞士,巴塞尔)产品。

1.3 乙醇致大鼠急性肝损伤模型的建立与治疗

雄性Wistar大鼠:(200±10) g,沈阳艾科赛斯生物科技有限公司产品。本研究经内蒙古民族大学附属医院伦理委员会批准(NMMZDX2020[K]0184)。实验前1周,所有动物在动物实验室适应环境。将大鼠分为正常组(CG),模型组(MG),低剂量(0.4767 g/kg)(LFC)、中剂量(1.4301 g/kg)(MFC)和高剂量(4.2903 g/kg)(HFC)红花给药组,每组8只。从第1天开始,正常组大鼠每天灌胃1次生理盐水,其他各组大鼠每天灌胃1次

酒精(8 mL/kg),连续灌胃28天制备CALI大鼠模型。第29天停止酒精灌胃,用生理盐水灌胃正常组和模型组大鼠,不同剂量红花组大鼠每天灌胃相应剂量的红花提取液,共21天。最后1次灌胃20 h后,将所有大鼠安乐死。从肝门静脉采集血液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以3 500 r/min离心10 min,将上清液立即冷冻,并储存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.4 生物化学与病理学检测

切割肝右叶,将其固定在10%甲醛溶液中进行苏木精和伊红(H&E)染色,分析肝细胞的病理变化,并通过显微镜观察标本。使用Multiscan FC微量板仪测量ALT和AST水平。

1.5 血液样品的制备

分析前将血清样品解冻,向100 μL 试样中加入400 μL 乙腈,涡旋30 s,并于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以12 000 r/min离心10 min,过0.22 μm 滤膜,取上清液,待测。

1.6 实验条件

1.6.1 色谱条件 色谱柱温度40 $^{\circ}\text{C}$;流速0.3 mL/min;流动相:A为0.1%甲酸-去离子水,B为甲醇;梯度洗脱程序:0~0.5 min(8%B),0.5~1.5 min(8%~60%B),1.5~6 min(60%~100%B),6~8 min(100%B),8~9 min(100%~8%B),9~10 min(8%B);样品注入体积10 μL 。

1.6.2 质谱条件 鞘气和辅助气均为高纯氮气,喷雾电压3.6 kV,毛细管和辅助气加热器温度分别为310、270 $^{\circ}\text{C}$ 。在正、负离子切换模式下收集质谱数据,质量扫描范围 m/z 100~1 000,全质量扫描(MS)分辨率为70 000。在二级串联质谱模式下,分辨率为17 500,MS²碰撞能量为30、35、40 eV。

1.7 数据分析

每天使用8个混合的血清质量控制(QC)样本测试仪器的稳定性,由Compound Discover 3.3软件完成峰值检测、对齐和归一化,将得到的二级质谱碎裂信息与mzCloud、ChemSpider、HMDB等数据库进行在线比对,进而得到相应的生物标志物信息,用于火山图分析。根据含量变化的倍数(>2倍)和 p 值($p<0.05$)筛选潜在的生物标志物。用社会科学统计软件包(SPSS 20.0)进行独立样本 t 检验, MATLAB 2012软件对组学数据进行分类, Cytoscape 3.2.1和HemI软件显示生物标志物的组间变化^[12]。

1.8 BP神经网络算法结合组学方法对样本分类的步骤

BP神经网络算法迭代处理训练数据,并将网络预测结果与实际结果进行比较。BP神经网络具有1个或多个隐藏层,使用1个隐藏层模型完成分类^[13]。利用BP神经网络处理组学数据的流程示于图1。

上述模型中有3层(输入层、隐藏层和输出层): p_j 代表第 j 个($j=1, 2, \dots, r$)输入层神经元, a_{1_i} 代表第 i 个($i=1, 2, \dots, s_1$)隐藏层神经元的输出, a_{2_k} 代表第 k 个($k=1, 2, \dots, s_2$)输出层神经元的输出, $w_{1_{ji}}$ 代表第 j 输入层神经元与第 i 隐藏层神经元之间的权重, $w_{2_{jk}}$ 代表第 j 隐藏层神经元与第 k 输出层神经元之间的权重。

隐藏层的输出如下:

$$a_{1_i} = f_1 \left(\sum_{j=1}^r w_{1_{ji}} p_j + b_{1_i} \right), i = 1, 2, \dots, s_1 \quad (1)$$

b_{1_i} 是输入层的偏置。 f_1 作为隐藏层神经元的激活函数,使用S形函数计算:

$$f_1(n) = \frac{1}{1 + e^{-n}} \quad (2)$$

输出层的输出如下:

$$a_{2_k} = f_2 \left(\sum_{i=1}^{s_1} w_{2_{ki}} a_{1_i} + b_{2_k} \right), k = 1, 2, \dots, s_2 \quad (3)$$

b_{2_k} 是隐藏层的偏置。 f_2 作为输出层神经元的激活函数,计算如下:

$$f_2(n) = n \quad (4)$$

使用误差函数可以计算期望输出与网络输

出之间误差的实际大小,误差函数如下:

$$E(w, B) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^{s_2} (t_k - a_{2_k})^2 \quad (5)$$

式中, t_k 是预期输出。通过反向修改网络权重,使网络预测结果(a_{2_k})与预期输出(t_k)之间的误差平方最小化。经过反复迭代,神经网络结构不断调整,当权重收敛时,学习过程终止。输出误差从隐藏层传递到输入层,每个神经元的权重可以逐层修正。在此过程中,通过计算每个神经元隐藏层的误差函数偏导数,利用每个神经元输出层的输出,以及隐藏层每个神经元的输入和输出水平完成加权值的修改。最后,使用Matlab 2012软件建立数据分类模型。

2 结果与讨论

2.1 生物化学与组织病理学分析

转氨酶是人体代谢过程中必不可少的“催化剂”,主要存在于肝细胞中,是肝细胞损伤最敏感、最特异的指标。AST存在于心肌细胞、肝细胞和骨骼肌细胞中,这些组织的损伤会提高AST水平^[14]。各组大鼠血清ALT和AST水平示于图2。与正常组相比,模型组的ALT和AST水平升高,表明乙醇导致了严重的肝细胞损伤;与模型组相比,高剂量红花组中的ALT和AST水平均显著降低,表明高剂量红花对CALI造成的肝损伤具有显著的治疗作用。

大鼠右肝叶的组织病理学变化示于图3。由图3a可见,对照组大鼠肝细胞圆润、饱满、形状

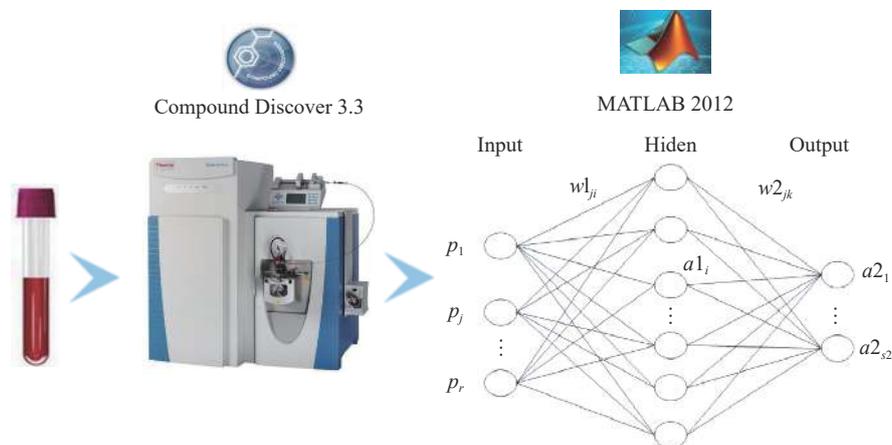
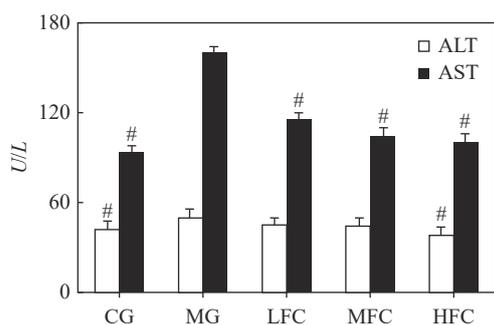


图1 使用BP神经网络模型处理组学数据的流程图

Fig. 1 Flowchart for processing omics data using a BP neural network model



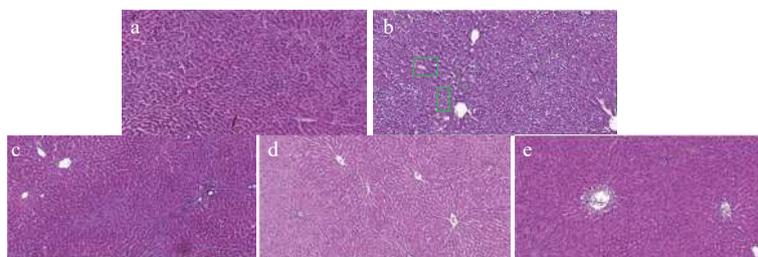
注: 数据显示为平均值±标准差(n=8),

#表示与模型组比较 $p < 0.05$

图2 大鼠血清 ALT 和 AST 指标

Fig. 2 Indices of ALT and AST in rat serum

清晰,小叶和肝索排列有序,未观察到炎性细胞。由图3b可见,模型组肝细胞增大,细胞核消



注: a. CG; b. MG; c. LFC; d. MFC; e. HFC

图3 大鼠右肝叶的组织病理学变化

Fig. 3 Histopathological changes of rat liver in right lobe

2.2 BP神经网络算法结合组学方法对样本分类的结果

CG、MG和HFC组的血清总离子流色谱图示于图4,通过BP神经网络算法能够发现不同组别之间的细微差异。

利用CG、MG、HFC(每组8只,共24只大鼠)建立了1个包含2963维数据的矩阵,输出数据被指定分为3类($s_2=3$),隐藏节点的数量 s_1 设为100。建模后,BP神经网络模型结合支持向量机(support vector machine, SVM)分类器^[15],得到的分类准确率为95.8%(23/24)(CG和HFC组中均有8个正确样本,MG组中有7个正确样本和1个错误样本);而PCA模型结合SVM分类器,得到的分类准确率为87.5%(21/24)(CG组中有8个正确样本,MG组中有7个正确样本和1个错误样本,HFC组中有6个正确样本和2个错误样本)。实验结果表明,BP神经网络模型比PCA模型的分类效果更好。值得注意的是,BP神经网络模型可以不借助其他分类器单独完成对组学数据的分类。

失,细胞死亡,肝细胞排列紊乱,细胞间隙变得模糊,肝细胞之间出现许多脂滴(图中绿色方形部分)。由图3c可见,与模型组相比,低剂量红花给药组的肝小叶组织完整,肝脏中炎性细胞数量减少,一些细胞开始恢复,但大鼠肝组织中仍存在脂滴和坏死细胞。由图3d可见,与模型组相比,中剂量红花给药组肝细胞的坏死显著减少,可见双核细胞(新的肝细胞),肝小叶组织完整,细胞间隙清晰,肝细胞之间的脂滴较少。由图3e可见,细胞的排列和状态与对照组相似,小叶结构和肝索排列规则,组织中的脂滴数量显著减少。这些结果表明,高剂量红花对CALI的治疗更有效。因此,选择高剂量红花给药组进行代谢组学实验。

2.3 潜在生物标志物的鉴定

各组大鼠血清代谢谱的火山图示于图5,用于检测潜在的生物标志物。在CG组和MG组之间共筛选出20种潜在的生物标志物,经红花

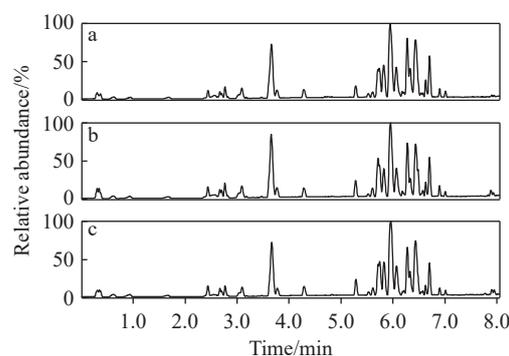
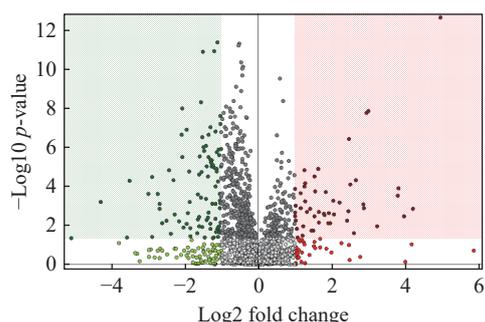


图4 正负离子切换模式下,对照组(a)、模型组(b)、高剂量红花给药组(c)的血清总离子流色谱图

Fig. 4 Total ion flow chromatograms of serum in control group (a), model group (b), and high-dose FC administration group (c) under switching mode of positive and negative ions



注: 绿色、红色阴影区域中的点分别表示生物标志物(MG-CG)水平降低和升高

图5 各组血清代谢谱的火山图

Fig. 5 Volcano plot of serum metabolic profiling of all groups

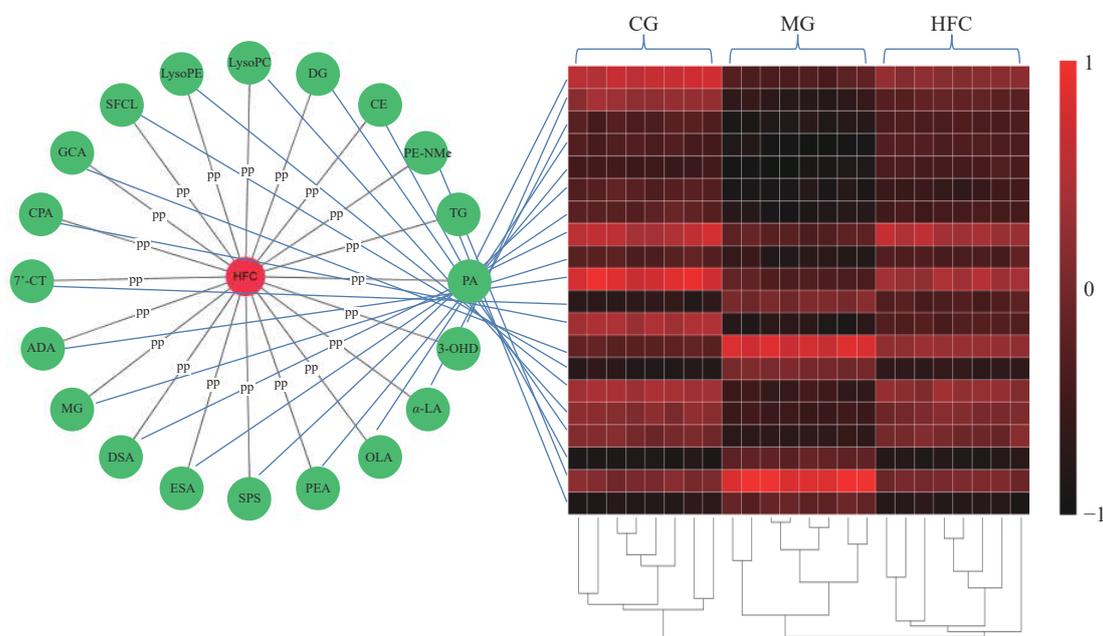
灌胃给药后, 这些生物标记物的表达水平回调, 表明红花可能通过影响这些生物标志物相关代谢通路而对 CALI 产生治疗作用。红花可调节的潜在生物标志物热图示于图 6。代表性生物标志物的一级质谱图示于图 7。生物标志物信息列于表 1。

2.4 红花对 CALI 代谢紊乱的调节

红花治疗 CALI 的可能机制示于图 8。CALI 是一种由乙醇及其衍生物代谢引起的炎症反应,

是氧化应激、肠内毒素和炎症介质相互作用的结果^[16]。肠屏障功能受损导致的肠内毒症和内毒素激活库普弗细胞导致的 CALI 出现恶化^[17-19]。肠源性内毒素可与脂多糖结合蛋白结合, 然后再与脂多糖结合形成脂多糖蛋白复合物。脂多糖诱导体内炎症细胞因子增加, 最终导致肝纤维化^[20]。此外, 乙醛加合物具有较强的免疫原性, 刺激机体产生抗体, 这些抗体会导致免疫损伤并损害重要的蛋白质, 包括蛋白酶和 DNA。在 CALI 发展的第一阶段, 酒精通过氧化应激刺激活性氧化物的增加, 从而诱导肝脏脂肪积累; 第二阶段, 在脂质过氧化和炎症细胞因子的共同作用下, 脂肪肝细胞发生炎症, 导致肝细胞坏死和纤维化^[21]。

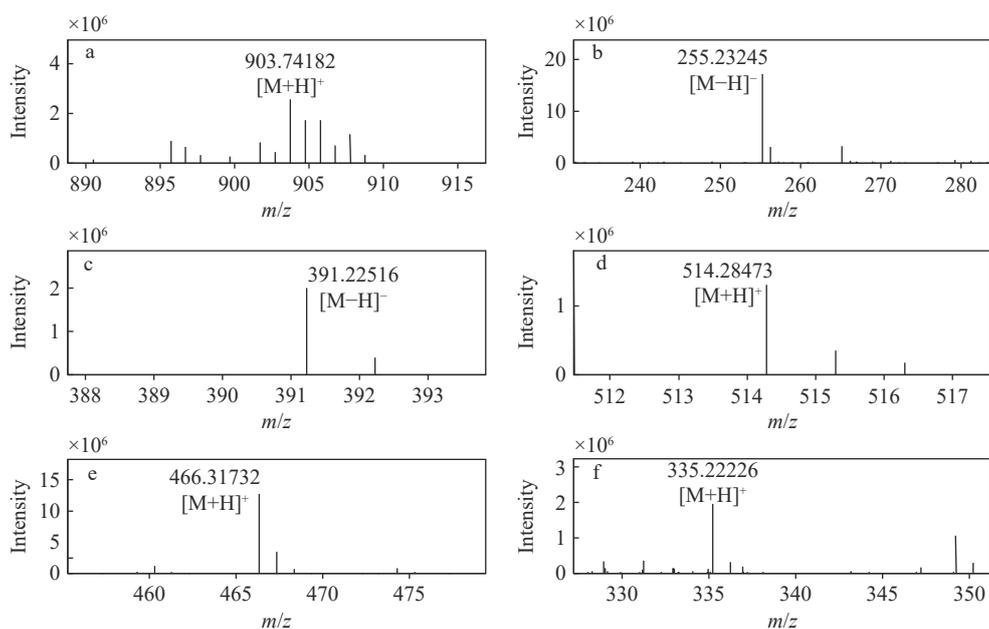
2.4.1 红花对脂肪酸和甘油三酯代谢的调节 CALI 可导致脂肪酸和甘油三酯代谢失调。 α -亚麻酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸是代表性的 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)。n-3 PUFA 的研究在营养生物化学中备受关注, 它们可以调节基因表达、维持细胞因子和脂蛋白平衡、预防心血管疾病、促进生长发育。n-3 PUFA 在调节免疫功能、抑制恶性肿瘤和控制心血管疾病中发



注: PA. 棕榈酸; 3-OHD. 3-氧代十六烷酸; α -LA. α -亚麻酸; OLA. 油酸; PEA. 十六酰胺乙醇; SPS. 鞘氨醇; ESA. 二十碳五烯酸; DSA. 二十二碳六烯酸; MG. 单酰基甘油酯; ADA. 肾上腺酸; 7-CT. 7-羧基- γ -生育酚; CPA. 环状磷脂酸; GCA. 甘胆酸; SFCL. 磺基多甘氨酸; LysoPE. 溶血磷脂酰乙醇胺; LysoPC. 溶血磷脂胆碱; DG. 二甘油酯; CE. 胆固醇二十碳五烯酸; PE-NMe. 磷脂酰乙醇胺; TG. 单花生四烯酸甘油三酯

图6 红花可调节的潜在生物标志物热图

Fig. 6 Heatmap of potential biomarkers that can be regulated by FC



注: a. 单花生四烯酸甘油三酯; b. 棕榈酸; c. 环状磷脂酸; d. 磺基多甘氨酸; e. 甘胆酸; f. 7'-羧基- γ -生育酚

图7 代表性生物标志物的一级质谱图

Fig. 7 Mass spectra of representative biomarkers

表1 正常组和模型组之间潜在的生物标志物

Table 1 Potential biomarkers between control group and model group

保留时间 Retention time/min	分子质量 Molecular weight	质量偏差 Mass deviation	化学式 Chemical formula	标志物 Biomarker	代谢途径 Metabolic pathway
8.235	660.4750	0.6	C ₄₃ H ₆₄ O ₅	二甘油酯	甘油三酯代谢
7.248	328.2607	2.1	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	单酰基甘油酯	甘油三酯代谢
8.175	902.7371	0.9	C ₅₉ H ₉₈ O ₆	单花生四烯酸甘油三酯	甘油三酯代谢
8.177	670.5677	1.8	C ₄₇ H ₇₄ O ₂	胆固醇二十碳五烯酸	脂肪酸代谢
7.180	256.2397	2.0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	脂肪酸代谢
6.126	270.2192	1.1	C ₁₆ H ₃₀ O ₃	3-氧代十六烷酸	脂肪酸代谢
7.231	332.2710	1.5	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	肾上腺酸	脂肪酸代谢
5.860	297.2675	2.4	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	十六酰胺乙醇	脂肪酸代谢
6.886	302.2238	2.6	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	二十碳五烯酸	脂肪酸代谢
7.226	282.2553	2.1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸	脂肪酸代谢
7.010	328.2396	1.8	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	二十二碳六烯酸	脂肪酸代谢
6.494	278.2254	2.9	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	α -亚麻酸	脂肪酸代谢
7.014	535.3655	3.2	C ₂₇ H ₅₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺	磷脂代谢
8.159	767.5452	1.7	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	磷脂酰乙醇胺	磷脂代谢
7.139	549.3805	2.0	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	溶血磷脂胆碱	磷脂代谢
6.665	392.2324	1.0	C ₁₉ H ₃₇ O ₆ P	环状磷脂酸	磷脂代谢
6.058	299.2831	2.3	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	鞘氨醇	鞘脂信号代谢
5.143	513.2754	1.2	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	磺基多甘氨酸	氨基酸代谢
5.716	465.3094	0.9	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	甘胆酸	胆汁酸代谢
5.242	334.2152	2.4	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	7'-羧基- γ -生育酚	维生素E代谢

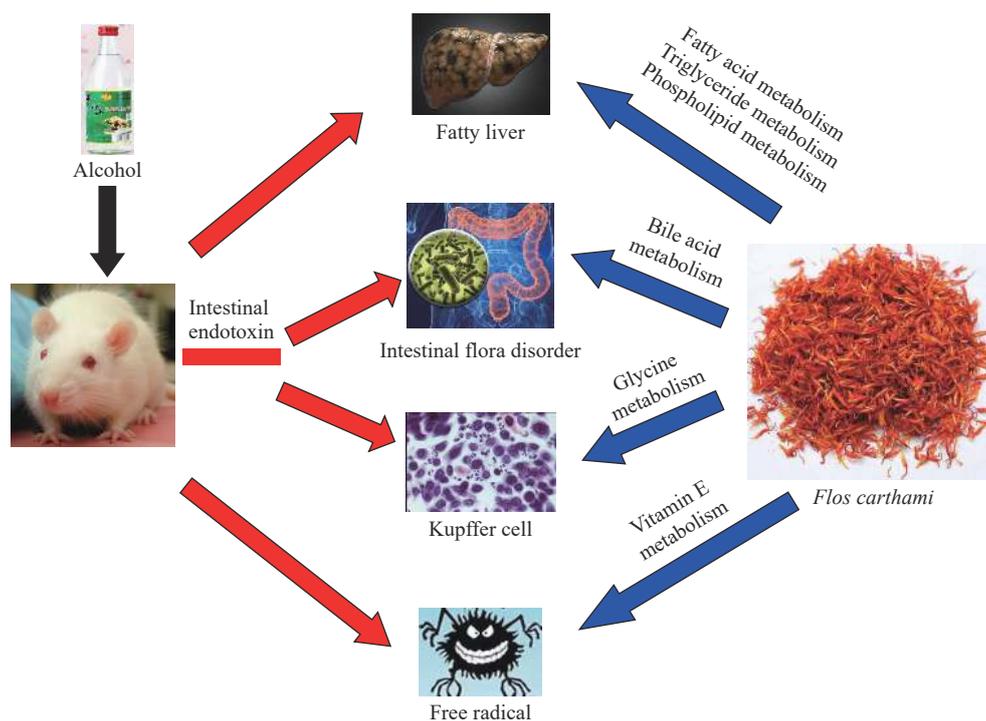


图8 红花对 CALI 的潜在治疗机制

Fig. 8 Potential therapeutic mechanism of FC on CALI

挥重要作用。研究表明^[22], n-3 PUFA可通过多种机制缓解酒精性肝病,包括减少脂肪生成、增强线粒体脂肪酸的 β -氧化、减少肝脏炎症和氧化应激,以及促进肠道环境平衡。酒精会导致高脂血症,即过量脂肪酸流入肝脏,导致肝脏脂肪变性。n-3 PUFA通过增加PDE3B活性和减少脂肪细胞中cAMP的积累来改善脂肪分解,这与GPR120激活和 $Ca^{2+}/CaMKK\beta/AMPK$ 信号调节有关,该过程阻断脂肪酸向肝脏的运输,改善脂肪功能障碍和肝脏损伤^[23]。酒精中毒是甘油三酯代谢紊乱的常见原因,DG(18:4n3/0:0/22.6n3)、MG(0:0/16:1(9Z)/0:0)和TG(18:1(11Z)/18:4(6Z, 9Z, 12Z, 15Z)/20:3n6)是典型的甘油三酯代谢产物。在慢性饮酒期间,线粒体发生渐进性变化,干扰柠檬酸循环,最终减少脂肪酸氧化。酮体产量的增加部分弥补了这种阻滞,导致酮症酸中毒。酒精有助于将积累的脂肪酸酯化为甘油三酯、磷脂和胆固醇酯,这进一步增加了肝脏的负担。累积的脂质部分被视为血清脂蛋白,可导致中度高脂血症。在长期饮酒期间,高脂血症的发生概率增加,这可能是内质网和高尔基体同时增生的结果。随着肝损伤的加重,高脂血症降低,但肝脏脂肪变性加重^[24]。红花给药后,脂肪酸和

甘油三酯的含量回调,表明红花可能通过影响脂肪酸和甘油三酯代谢而对CALI产生调节作用。

2.4.2 红花对磷脂代谢的调节 磷脂具有激活细胞、维持新陈代谢、基础代谢、平衡分泌激素和增强人体免疫力等功能,此外,还可以改善体内脂肪和胆固醇的代谢,有利于预防脂肪肝和心血管疾病^[25-26]。CALI可导致磷脂代谢失调。鞘磷脂是细胞膜的重要组成部分,可以调节重要的细胞生理活动,如细胞生存、增殖、凋亡、分化、迁移和免疫反应。鞘氨醇是一种代表性的鞘脂,具有在肝脏损伤后以复杂方式再生的独特能力,涉及鞘氨醇等多种介质^[27]。红花给药后,磷脂含量回调,表明红花对磷脂代谢有调节作用。

2.4.3 红花对氨基酸、胆汁酸和维生素E代谢的调节 CALI会导致氨基酸、胆汁酸和维生素E代谢紊乱。酒精引起肝毒性的一个重要表现是产生肠内毒素,这会激活库普弗细胞,而抑制库普弗细胞活化是治疗酒精性肝炎的有效方法。甘氨酸是一种免疫调节氨基酸,富含甘氨酸的食物通过阻止库普弗细胞活性增加了内毒素失活的可能性,其可防止库普弗细胞引起的细胞内钙浓度增加,并将LPS受体信号传导和细胞因子产生的影响降至最低。硫代石胆酰甘氨酸是一种

甘氨酸代谢产物,能够促进氯离子流入库普弗细胞,从而减少肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生,以预防肝损伤^[28]。因此,甘氨酸可以防止缺氧-复氧诱导的肝损伤,降低内毒素引起的肝细胞死亡率,并通过降低血液中酒精水平来减少酒精性肝损伤。摄入富含甘氨酸的食物可以加速酒精性肝损伤的恢复过程^[29]。甘胆酸是一种胆汁酸代谢产物,作为胆汁的组成部分参与脂肪代谢,对肠肝循环系统具有保护作用。此外,胆汁酸也可以参与胆固醇和甘油三酯的代谢。肠道微生物可以通过调节胆汁酸代谢来减少酒精肝损伤^[30]。酒精摄入会导致肠道微生物群发生变化,从而加剧疾病进展。7'-羧基- γ -生育酚是生育酚的代谢产物,而生育酚是维生素E的水解产物,其可以增加细胞的抗氧化作用,改善脂质代谢,预防心血管疾病。在肝脏再生过程中,酒精代谢产生的大量自由基会导致细胞损伤和肝功能改变,而维生素E可以减少肝脏脂质过氧化,显著改善酒精性肝损伤^[31]。红花给药后,硫代石胆酰甘氨酸、甘胆酸和7'-羧基- γ -生育酚的含量均恢复到正常水平,表明红花可能通过影响这些物质的代谢过程而对CALI产生调节作用。

3 结论

本文建立了大鼠慢性酒精性肝损伤模型,利用大鼠血清代谢组学分析方法结合超高效液相色谱-质谱技术鉴定与CALI相关的生物标志物,并进一步阐明红花对这些生物标志物相关代谢通路的调控作用。H&E染色实验发现,红花提取物减轻了肝细胞的损伤程度;同时,红花组中的丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸氨基转移酶的表达水平降低,表明红花提取物具有肝保护作用。BP神经网络模型分类准确率为95.8%,分类效果良好。通过火山图分析共鉴定出20种与CALI相关的生物标志物,红花能够对这些生物标志物相关代谢通路产生调控作用,从而揭示红花在CALI治疗过程中的分子作用机制。未来,我们将使用基因组学和蛋白质组学方法验证代谢组学获得的代谢通路,并进一步探索红花调节这些代谢通路的机制。

参考文献:

[1] 李丽美,臧清策,张瑞萍,再帕尔·阿不力孜.基于质谱

技术的代谢组学在体外药物肝毒性评价中的研究进展[J].质谱学报,2021,42(5):772-786.

LI Limei, ZANG Qingce, ZHANG Ruiping, ABLIZ Zeper. Mass spectrometry-based metabolomics in the study of *in vitro* drug hepatotoxicity evaluation[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 772-786(in Chinese).

- [2] RODRIGUEZ J M, MONSALVES-ALVAREZ M, HENRIQUEZ S, LLANOS M N, TRONCOSO R. Glucocorticoid resistance in chronic diseases[J]. *Steroids*, 2016, 115: 182-192.
- [3] ADDOLORATO G, ANCONA C, CAPRISTO E, GABBARRINI G. Metadoxine in the treatment of acute and chronic alcoholism: a review[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2003, 16(3): 207-214.
- [4] LEI X, ZHANG J, XU Q, LI J, QIAN Y, ZHANG J, LIU L, ZHONG W, WANG Y, HAN X, TANG J, ZENG M, MAO Y. Exploring the efficacy and safety of polyene phosphatidylcholine for treatment of drug-induced liver injury using the Roussel Uclaf causality assessment method: a propensity score matching comparison[J]. *Journal of International Medical Research*, 2021, 49(8): 030 006 052 110 398.
- [5] XI S, YUE L, SHI M, PENG Y, XU Y, WANG X, LI Q, KANG Z, LI H, WANG Y. The effects of Taoren-Honghua herb pair on pathological microvessel and angiogenesis-associated signaling pathway in mice model of CCl₄-induced chronic liver disease[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016: 2 974 256.
- [6] AO H, FENG W, PENG C. Hydroxysafflor yellow A: a promising therapeutic agent for a broad spectrum of diseases[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 8 259 280.
- [7] ZHANG Y, GUO J, DONG H, ZHAO X, ZHOU L, LI X, LIU J, NIU Y. Hydroxysafflor yellow A protects against chronic carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 660(2/3): 438-444.
- [8] JIANG S, SHI Z, LI C, MA C, BAI X, WANG C. Hydroxysafflor yellow A attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury by suppressing macrophage activation[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(5): 2 595-2 608.
- [9] CLEOPHAS T J, CLEOPHAS T F. Artificial intelligence for diagnostic purposes: principles, procedures and

- limitations[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2010, 48(2): 159-165.
- [10] RINGNÉR M. What is principal component analysis?[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(3): 303-304.
- [11] POMYEN Y, WANICHTHANARAK K, POUNGSOMBAT P, FAHRMANN J, GRAPOV D, KHOOMRUNG S. Deep metabolome: applications of deep learning in metabolomics[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, 18: 2 818-2 825.
- [12] DENG W, WANG Y, LIU Z, CHENG H, XUE Y. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111988.
- [13] CAO J, CUI H, SHI H, JIAO L. Big data: a parallel particle swarm optimization-back-propagation neural network algorithm based on MapReduce[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157551.
- [14] SOOKOIAN S, PIROLA C J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(3): 711-725.
- [15] VALKENBORG D, ROUSSEAU A J, GEUBBELMANS M, BURZYKOWSKI T. Support vector machines[J]. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2023, 164(5): 754-757.
- [16] ROCCO A. Alcoholic disease: liver and beyond[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(40): 14 652.
- [17] TSUTSUI H, NISHIGUCHI S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(5): 7 711-7 730.
- [18] LI P, HE K, LI J, LIU Z, GONG J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 85: 222-229.
- [19] SATO K, HALL C, GLASER S, FRANCIS H, MENG F, ALPINI G. Pathogenesis of Kupffer cells in cholestatic liver injury[J]. *The American Journal of Pathology*, 2016, 186(9): 2 238-2 247.
- [20] ZHOU Y P, XIA Q. Inhibition of miR-103a-3p suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and liver injury by regulating FBXW7 expression[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(9): 1 798-1 810.
- [21] JAESCHKE H, MCGILL M R, RAMACHANDRAN A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2012, 44(1): 88-106.
- [22] WANG M, MA L J, YANG Y, XIAO Z, WAN J B. N-3 polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: a critical review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(Suppl): S116-S129.
- [23] WANG M, ZHANG X, MA L J, FENG R B, YAN C, SU H, HE C, KANG J X, LIU B, WAN J B. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate ethanol-induced adipose hyperlipolysis: a mechanism for hepatoprotective effect against alcoholic liver disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2017, 1 863(12): 3 190-3 201.
- [24] BARAONA E, LIEBER C S. Effects of ethanol on lipid metabolism[J]. *Journal of Lipid Research*, 1979, 20(3): 289-315.
- [25] WANG B, TONONNOZ P. Phospholipid remodeling in physiology and disease[J]. *Annual Review of Physiology*, 2019, 81: 165-188.
- [26] LAGACE T A, RIDGWAY N D. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2013, 1 833(11): 2 499-2 510.
- [27] NOJIMA H, FREEMAN C M, GULBINS E, LENTSCH A B. Sphingolipids in liver injury, repair and regeneration[J]. *Biological Chemistry*, 2015, 396(6/7): 633-643.
- [28] YAMASHINA S, IKEJIMA K, ENOMOTO N, TAKEI Y, SATO N. Glycine as a therapeutic immuno-nutrient for alcoholic liver disease[J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2005, 29(11): 162S-165S.
- [29] YIN M, IKEJIMA K, ARTEEL G E, SEABRA V, BRADFORD B U, KONO H, RUSYN I, THURMAN R G. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998, 286(2): 1 014-1 019.
- [30] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16(4): 235-246.
- [31] OKAMURA Y, OMORI A, ASADA N, ONO A. Effects of Vitamin C and E on toxic action of alcohol on partial hepatectomy-induced liver regeneration in rats[J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2018, 63(1): 50-57.

(收稿日期: 2024-01-31; 修回日期: 2024-07-08)