

· 组学研究 ·

清热化痰通腑方干预卒中相关性肺炎大鼠的血清代谢组学研究

赵亮娟, 刘霞, 李凯, 吕军影(广西医科大学第一附属医院中医科, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术探讨清热化痰通腑方(HTF)对卒中相关性肺炎(SAP)大鼠血清代谢组的影响,旨在寻找血清中的内源性差异代谢物及其相关代谢通路,以阐释 HTF 治疗 SAP 的作用机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组,每组 7 只。采用改良线栓法结合气管注射铜绿假单胞菌法复制 SAP 模型。造模同时给予大鼠 HTF 药液 $38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌肠,给药体积为 $38 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 7 d。应用 UPLC-Q-TOF/MS 技术进行血清样品的分离和数据采集,通过主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法分析 HTF 对内源性差异代谢物的影响,并通过 MetaboAnalyst 3.0 数据库分析其代谢通路。**结果** 在正、负离子模式下共筛选鉴定出 22 种内源性差异代谢物。与模型组比较,HTF 治疗组大鼠血清中的 N-乙酰谷氨酸、顺乌头酸、雌激素、癸二酸、维生素 E、酪氨酸、脱氧胞苷、莽草酸及胞苷含量显著升高($P < 0.01$),3-甲氧基-L-酪氨酸、白三烯 B₄、苯乙酰甘氨酸、磷酸丝氨酸、前列腺素 E₂、前列腺素 F₂ α 、血栓素 B₂、11-脱氧皮质酮、19-氧睾酮、前列腺素 E₃、前列腺素 F₁ α 、油酸以及棕榈酸含量显著降低($P < 0.01$)。22 个潜在生物标志物主要涉及 15 条异常代谢通路,其中与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,花生四烯酸代谢,柠檬酸循环(TCA 循环),脂肪酸生物合成,类固醇激素生物合成,嘧啶代谢以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等 7 条代谢通路密切相关。**结论** HTF 对 SAP 大鼠的治疗作用可能与其改善血清中内源性代谢物的水平,调节花生四烯酸代谢、脂质代谢以及能量代谢等有关。

关键词: 卒中相关性肺炎;清热化痰通腑方;代谢组学;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱;作用机制;内源性代谢物;大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)05-0684-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.013

Metabolomics Study on the Mechanism of Qingre Huatan Tongfu Decoction on Stroke-associated Pneumonia in Rats

ZHAO Liangjuan, LIU Xia, LI Kai, LYU Junying (Department of Traditional Chinese Medicine The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021 Guangxi, China)

Abstract: Objective Using the metabolomics technology based on UPLC-Q-TOF/MS, the effects of Qingre Huatan Tongfu decoction (HTF) on stroke-associated pneumonia (SAP) rats was explored, and the relevant potential biomarkers and metabolic pathways of serum were screened to explain the mechanism of HTF treatment of SAP.

Methods Male SD rats were randomly divided into Sham-operated group (J), model group (M) and treatment group (Z), 7 rats in each group. Except the group J, SAP models were established in the other two groups by modified suture embolization combined with tracheal injection. Group M was treated with HTF $38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, dosing volume was $38 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, while the other two groups were treated with normal saline for 7 days. UPLC-Q-TOF/MS

收稿日期: 2020-06-24

作者简介: 赵亮娟,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗脑病。Email: 970710201@qq.com。共同第一作者:刘霞,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗脑病。Email: 278203580@qq.com。通信作者:吕军影,女,硕士研究生导师,教授,研究方向:中西医结合治疗脑病。Email: lujunying007@163.com。

基金项目: 广西自然科学基金项目(2018JJD140051);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教发[2014]20号);广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2018 050)。

technology was applied to analyze the serum of rats in each group, multivariate statistical methods such as Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) were used to screen the relevant potential metabolites, and metabolic pathways were analyzed by MetaboAnalyst 3.0. **Results** Twenty-two potential differential endogenous metabolites were identified in the positive and negative ion modes. Compared with the M group, HTF can significantly increase the concentrations of estrogen, N-acetylglutamate acid, sebacic acid, cytidine, deoxycytidine, cisaconitic acid, vitamin E, tyrosine and shikimic acid ($P < 0.01$), and while significantly decreased the biomarkers, concentrations of Phosphoserine, 3-methoxy-L-tyrosine, thromboxane B, leukotriene B₄, prostaglandin E₂, prostaglandin F_{1 α} , phenylacetylglycine, prostaglandin F_{2 α} , 11-deoxycorticosterone, 19-oxytestosterone, The concentration of prostaglandin E₃, palmitic acid and oleic acid ($P < 0.01$). The relevant potential biomarkers totally involved in 15 metabolic pathways, and among them are arachidonic acid metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, citric acid cycle (TCA cycle), steroid hormone biosynthesis, pyrimidine metabolism and fatty acids, a total of 7 metabolic pathways are closely related. **Conclusion** The therapeutic effect of HTF on SAP rats may be related to improving the levels of endogenous metabolites in serum, regulating arachidonic acid metabolism, fatty acids and energy metabolism, and then restoring the metabolism to be normal *in vivo*.

Keywords: Stroke-associated pneumonia; Qingre Huatan Tongfu decoction; metabonomics; UPLC-Q-TOF/MS; mechanism; endogenous metabolites; rats

脑卒中已成为一种常见的脑血管疾病,具有高发病率、致残率及致死率,严重危害患者的身心健康^[1]。卒中相关性肺炎(Stroke-associated pneumonia, SAP)作为脑卒中常见的一种并发症,不仅再次加重患者身心负担,甚至进一步削弱神经功能的恢复,增加病死率,影响预后。SAP的主要病因为外邪入侵,痰热阻肺,致脏腑功能失调,其病位主要在肺,常伴有便秘、口干等症状,符合“肺与大肠相表里”的中医理论^[2]。临床上痰热壅肺为SAP的基本证型^[3],常以清热化痰、通腑泻热等为主要治法。清热化痰通腑方(HTF)由大承气汤去厚朴加黄芩、牛膝、瓜蒌仁、石菖蒲、胆南星组成,具有清热化痰、逐瘀通腑的功效,主要依据“肺-脑-肠相通”的中医理论对SAP进行辨证治疗^[2]。本课题前期研究^[4-5]表明,HTF直肠滴注可以改善轻、中度脑病意识障碍患者的临床症状,减轻脑病并发肺部感染患者的炎症反应,但具体作用机制尚不清楚。故本研究拟基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术的代谢组学方法^[6],探讨HTF对SAP模型大鼠的干预作用及调控机制,以为临床SAP的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性SD大鼠,21只,SPF级,体质量

(220±20)g,由广西医科大学动物实验中心提供并统一饲养,实验动物生产许可证号:SCXK(桂)2014-0002,动物使用许可证号:SCXK(桂)2014-0003;实验前动物适应性饲养3d,饲养条件:室温为20~25℃,相对湿度为45%~65%,分笼饲养,自由饮水、进食。

1.2 药物及试剂 大黄30g(后下)、枳实20g、芒硝15g(冲服)、黄芩20g、瓜蒌仁30g、石菖蒲20g、胆南星20g、牛膝30g,以上中药饮片均由广西医科大学第一附属医院中药房提供,经广西医科大学第一附属医院药剂科黄振光教授鉴定均为正品。HPLC级乙腈,美国Thermo Fisher公司,批号:A998-4;HPLC级甲酸,美国Tedia公司,批号:FS0630-015。铜绿假单胞菌标准菌株,中国食品药品检定研究院,批号:10104。

HTF灌肠药液的制备:除大黄和芒硝外,将其余药物加足量超纯水浸泡30min后,武火煎煮至沸腾,再转文火煎煮30min,滤出药液;剩余药渣中再次加同等量超纯水,煎煮15min后,加入大黄,继续煎5min,滤出药液;合并2次滤液,加入芒硝,充分搅拌均匀;再次过滤药液后,采用旋转蒸发仪浓缩至浓度为1g·mL⁻¹的灌肠药液,4℃保存备用。

1.3 主要仪器 UPLC Acquity™超高效液相色谱系统、XEVO G2-SQ-TOF串联四级杆飞行时间质谱

仪, 美国 Waters 科技公司; DN-24A 型氮气吹干仪, 上海比朗仪器有限公司; VORTEX GENIUS 3 型漩涡混匀器, 德国 IKA 公司; MicroCL17R 型高速冷冻离心机, 德国 THERMOIEC 公司; TLE204 型电子分析天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.4 分组、模型复制及给药 雄性 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后, 将其随机分为假手术组、模型组及治疗组, 每组 7 只。模型组及治疗组均采用改良线栓法结合气管注射铜绿假单胞菌法^[7]建立 SAP 大鼠模型。造模前 12 h, 大鼠禁食、不禁水。造模开始前, 无菌操作台进行紫外线消毒 30 min, 以 10% 水合氯醛 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉大鼠。将大鼠仰卧位固定于无菌操作台上, 颈部备皮后常规铺展消毒铺巾, 于颈部正中做 $1.0 \sim 1.5 \text{ cm}$ 切口; 钝性分离右侧颈部筋膜、肌肉组织, 充分暴露手术视野; 分离右侧颈总动脉、迷走神经、颈外动脉和颈内动脉, 结扎颈总动脉近心端、颈外动脉近心端; 以悬拉丝线的方法阻断颈内动脉血供后, 在距离颈总动脉分叉处约 5 mm 的血管壁上横向剪一小切口, 用镊子沿平行血管方向缓慢轻柔插入制备好的线栓, 同时缓慢放松丝线并轻柔推进线栓约 $1.8 \sim 2.0 \text{ cm}$, 使线栓头端到达大脑中动脉起始处, 以有抵触感为度; 然后固定线栓, 剪去多余的线, 并进行消毒。分离大鼠气管, 使用 1 mL 注射器注入 0.2 mL 铜绿假单胞菌细菌悬液, 随即缓慢将大鼠竖立保持 30 s, 使细菌悬液均匀分布于两肺, 最后缝合手术切口。假手术组的操作步骤同模型组, 但不插入线栓, 不注入铜绿假单胞菌液。

采用 Longa 评分法^[8]进行神经功能缺损评分: 无神经功能缺损症状, 0 分; 有轻度神经功能缺损表现, 不能完全伸展左侧前爪, 1 分; 有中度局灶性神经功能缺损表现, 向左侧转圈, 2 分; 有重度局灶性神经功能缺损表现, 向左侧倾倒, 3 分; 不能自主行走, 意识水平下降, 4 分。以 2~3 分为脑梗死模型复制成功^[9]。细菌性肺炎模型的评价标准主要依据细菌学指标(肺组织培养菌落计数)及肺组织病理检查^[7,10]: 肺组织匀浆培养活菌数 $>10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$; 肺脏组织病理学改变以水肿、充血、纤维素渗出、中性粒细胞浸润等为主。

根据人与动物的用药剂量折算系数表^[11], 60 kg 成人与 200 g 大鼠的换算系数为 6.17; 清热化痰通腑方成人用药剂量为 $185 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 换算成大鼠的给药剂量为 $3.8 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 2 倍给药剂量为 $7.6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 即 $38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 药物浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 故每只大鼠灌肠

给药体积为 $38 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。模型建立 6 h 后, 治疗组予以 HTF 药液灌肠给药, 假手术组、模型组灌肠等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 7 d。

1.5 血清样品收集及预处理 大鼠末次灌肠给药后, 禁食 6 h, 经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉。采用腹主动脉取血 5 mL 至无抗凝采血管中, 室温下静置约 2 h; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以离心半径 9 cm 、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离上层血清, 置 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

检测前, 以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻血清样品; 取 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 血清, 加入乙腈 $400 \text{ }\mu\text{L}$, 室温下漩涡 30 s, 以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 9 cm 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 至 1.5 mL 新 EP 管中; 氮气吹干后加 50% 乙腈 $150 \text{ }\mu\text{L}$, 漩涡 30 s, 以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 9 cm 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清液 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 至进样瓶中, 待测。

1.6 血清代谢组 UPLC-Q-TOF/MS 分析 色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \text{ }\mu\text{m}$); 柱温: $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇, 梯度洗脱 ($0 \sim 2 \text{ min}$, $95\% \sim 70\% \text{ B}$; $2 \sim 7 \text{ min}$, $50\% \sim 30\% \text{ B}$; $7 \sim 9 \text{ min}$, $30\% \sim 0\% \text{ B}$; $9 \sim 18 \text{ min}$, $100\% \text{ A}$); 正、负离子流速: 0.4 、 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $2 \text{ }\mu\text{L}$ 。

质谱条件: 四极杆飞行时间质谱, 采用电喷雾离子源, 分别采用正、负离子模式进行扫描; 雾化气: N_2 ; 碰撞气: Ar ; 质量扫描范围: 低能量为 $50 \sim 1\,200 \text{ Da}$, 高能量为 $100 \sim 1\,200 \text{ Da}$; 离子源温度: $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气体温度: $450 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 碰撞能量: 低能量为关, 高能量为 $20 \sim 40 \text{ V}$; 毛细管电压: 3.00 kV ; 锥孔电压: 40 V ; 源偏离电压: 80 V ; 锥孔气体流量: $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 脱溶剂气体流速: $700 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 校正液: 亮氨酸脑啡肽(正离子, m/z 556.277 1; 负离子, m/z 554.261 5)。

为保证整个实验分析系统的稳定性, 本次实验采用质控样品(Quality control, QC)进行方法验证, 由每个正常血清样品各取 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 混合而得。进样前平衡仪器, 先检测 3 个 QC 样品; 在样品检测时, 需要在 3 个样品检测后进行 1 个 QC 样品检测。同时, 在样品检测后需要插入空白分析, 以避免交叉污染。

1.7 统计学处理方法及代谢组学数据处理、分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

通过 Waters 系列质谱仪的数据分析软件 Masslynx V4.1 对样品进行色谱峰检测、去噪、峰匹配及提取等处理后,得到正、负离子模式下的总离子流(TIC)图,并提取相关数据进行下一步多元统计分析。采用 EZinfo 2.0 软件对所得数据进行无监督模式的主成分分析(PCA)及有监督模式的正交偏最小二乘判别法(OPLS-DA)分析,得到能够反应组间贡献率的代谢物变量重要性投影(VIP)值散点图。通过 OPLS-DA 模型的 VIP 值对差异变量进行筛选,选择 VIP 值>1 且 $P < 0.05$ (成组 t 检验)的差异代谢物进行初步鉴定,进一步结合 Metlin 标准库(<https://metlin.scripps.edu/>)的一级质谱图和二级质谱图进行对比、鉴定,以及通过 KEGG (<http://www.kegg.jp/>)在线数据库解析差异代谢物,最后通过 MetaboAnalyst 3.0 数据库(<http://www.metaboanalyst.ca>)对所鉴定的代谢物进行通路图的构建(Pathway impact > 0.01)和分析,筛选出与 SAP 密切相关的潜在生物标志物及相关代谢通路。

2 结果

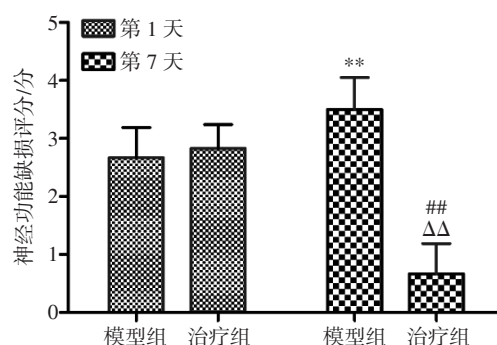
2.1 HTF 对 SAP 大鼠神经功能缺损评分的影响

假手术组大鼠第 1 天、第 7 天的神经功能缺损评分均为 0 分,表明假手术组复制成功,大鼠未出现因手术操作而致脑梗死发生。与同组第 1 天比较,模型组大鼠的神经功能缺损评分明显升高($P < 0.01$),治疗组大鼠的神经功能缺损评分明显降低($P < 0.01$);造模第 7 天,与模型组比较,治疗组大鼠的神经功能缺损评分明显降低($P < 0.01$)。结果表明,HTF 可促进 SAP 大鼠神经功能的恢复,有效改善其神经功能的缺损症状。结果见图 1。

2.2 大鼠血清代谢图谱的建立 采用 UPLC-Q-TOF/MS 对血清样品进行分离及数据采集,得到正、负离子模式下的各组大鼠血清代谢图谱,见图 2。结果表明各组大鼠血清的总离子流图谱轮廓基本相似,但是峰响应值存在一定差异,提示大鼠的血清内源性代谢物发生了变化。

2.3 HTF 干预 SAP 大鼠血清代谢组的 PCA 分析

结果见图 3。正、负离子模式下,各组大鼠血清样品能够很好地聚类。假手术组和模型组血清样品明显分离,无交叉和重叠,说明 SAP 模型大鼠体内发生了明显的代谢差异改变。治疗组和模型组分离良好,且治疗组样品更倾向于假手术组,说明 HTF 对 SAP 大鼠血清中的异常内源性差异代谢物具有回调作用。此外,正、负离子模式下的 QC 样品均能够很



注:与治疗组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组第 1 天比较, $**P < 0.01$;与治疗组第 1 天比较, $##P < 0.01$

图 1 清热化痰通腑方对卒中相关性肺炎大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Figure 1 The effect of Qingre Huatan Tongfu decoction on neurological deficit scores in rats with stroke-associated pneumonia($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

好地聚类,且均处于 95%的置信区间内,表明 QC 样品在本次实验中发挥了质控作用,检测仪器稳定性、重复性良好。

2.4 HTF 干预 SAP 大鼠血清代谢组的 OPLS-DA 分析

为能进一步阐释各组血清样品之间的差异,采用 EZinfo 2.0 软件对各组样品进行 OPLS-DA 分析,结果见图 4。不同组血清样品可明显分离且同组样品在组内聚集良好,表明各组血清样品的组内差异不大,而组间差异明显。同时得到能够解释数据可靠性的模型验证参数 R^2_Y 和 Q^2 值:正离子模式下,模型组和假手术组的 R^2_Y 、 Q^2 值分别为 0.976、0.890,治疗组和模型组的 R^2_Y 、 Q^2 值分别为 0.951、0.906;负离子模式下,模型组和假手术组的 R^2_Y 、 Q^2 值分别为 0.928、0.806,治疗组和模型组的 R^2_Y 、 Q^2 值分别为 0.974、0.951。上述 R^2_Y 、 Q^2 值越接近于 1,表明 OPLS-DA 模型对不同组别样品之间的差异具有较好的解释和预测能力。

为继续检验模型是否存在过拟合现象,采用 SIMCA 13.0 软件进行置换检验 200 次,结果见图 5。结果表明,回归线斜率较大且与纵轴截距均小于 0,说明模型未出现过拟合现象,该 OPLS-DA 模型可靠、稳定。

2.5 潜在生物标志物的筛选及鉴定 通过 OPLS-DA 模型分析得到血清代谢物的 VIP 散点图,见图 6。将 VIP 值 > 1 且 $P < 0.05$ 的代谢物作为与 SAP 关系密切的差异代谢物。根据其质荷比、精确分子量和质谱结果,通过与 Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>)质谱库进行质谱信息匹配,根据 Peak view 提供的二级

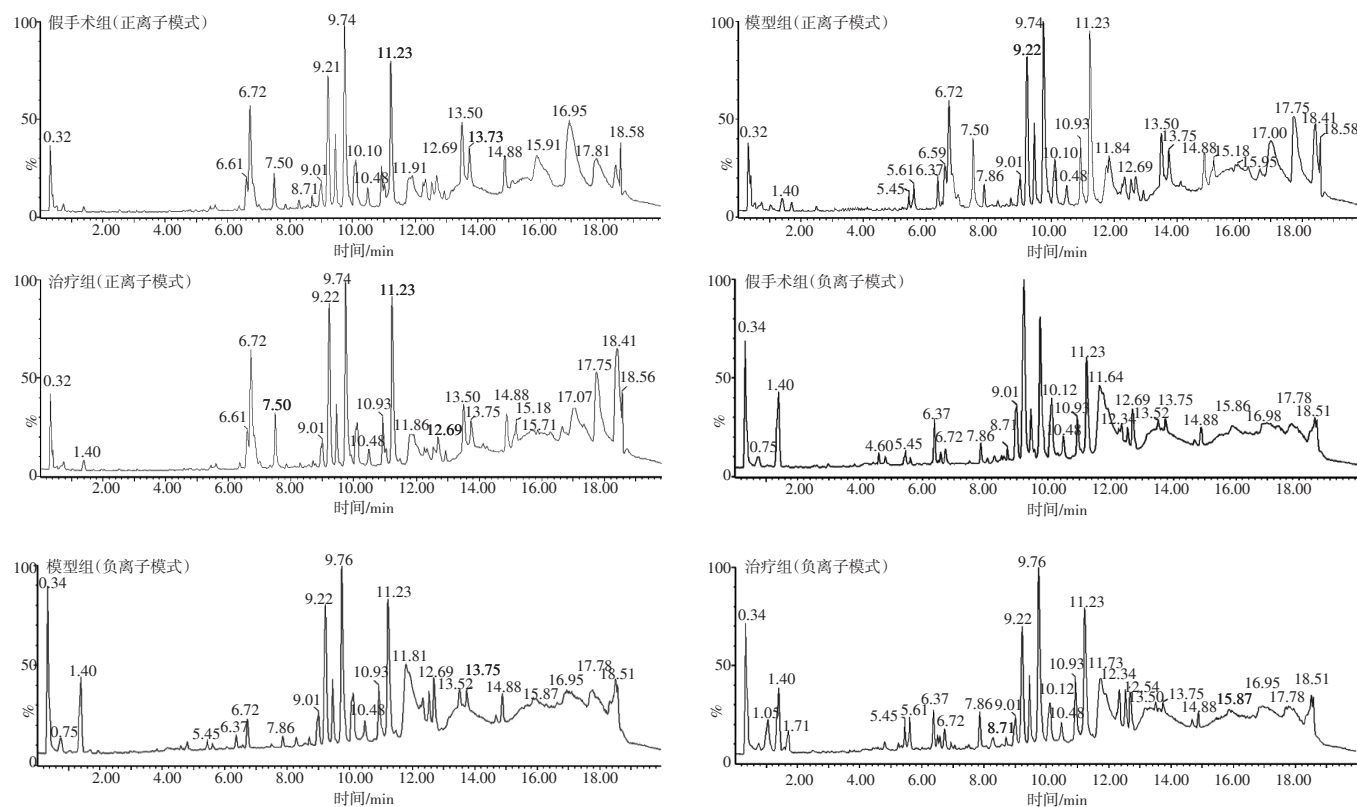


图2 各组大鼠血清在正、负离子模式下的总离子流图

Figure 2 Total ion flow spectra of rats' serum in positive and negative ion mode

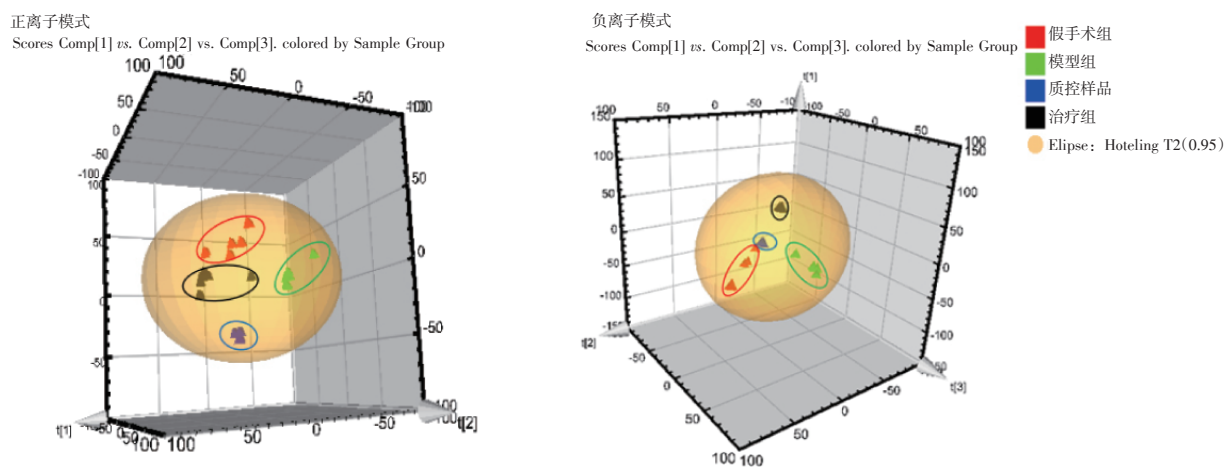


图3 清热化痰通腑干预卒中相关性肺炎大鼠血清代谢组的PCA分析结果

Figure 3 The results of PCA analysis of serum metabolomics in rats with stroke-associated pneumonia treated with *Qingre Huatan Tongfu* decoction

质谱数据与数据库进行比对分析后对差异代谢物进行鉴定(顺乌头酸的鉴定示例见图7),结果共得到22个潜在生物标志物,见表1、表2。结果显示,与假手术组比较,模型组血清中3-甲氧基-L-酪氨酸、磷酸丝氨酸、白三烯B₄、苯乙酰甘氨酸、油酸、前列腺素E₂、前列腺素F₂α、血栓素B₂、11-脱氧皮质酮、前列腺素F₁α、19-氧睾酮、棕榈

酸及前列腺素E₃含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),雌激素、莽草酸、癸二酸、酪氨酸、脱氧胞苷、顺乌头酸、胞苷、N-乙酰谷氨酸及维生素E的含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,治疗组血清中N-乙酰谷氨酸、顺乌头酸、雌激素、癸二酸、维生素E、酪氨酸、脱氧胞苷、莽草酸及胞苷含量显著升高($P < 0.01$),3-甲氧基-L-酪氨

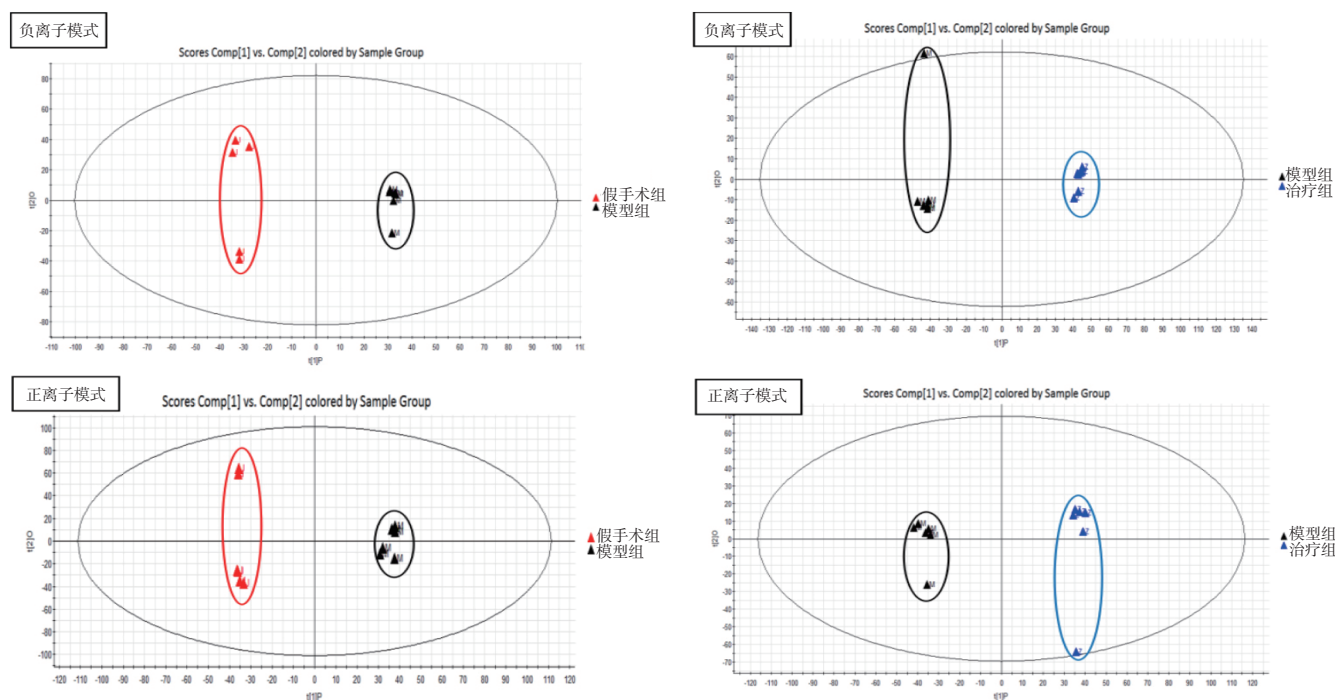


图 4 清热化痰通腑方干预卒中相关性肺炎大鼠血清代谢组的 OPLS-DA 分析结果

Figure 4 The results of OPLS-DA analysis of serum metabolomics in rats with stroke-associated pneumonia treated with *Qingre Huatan Tongfu* decoction

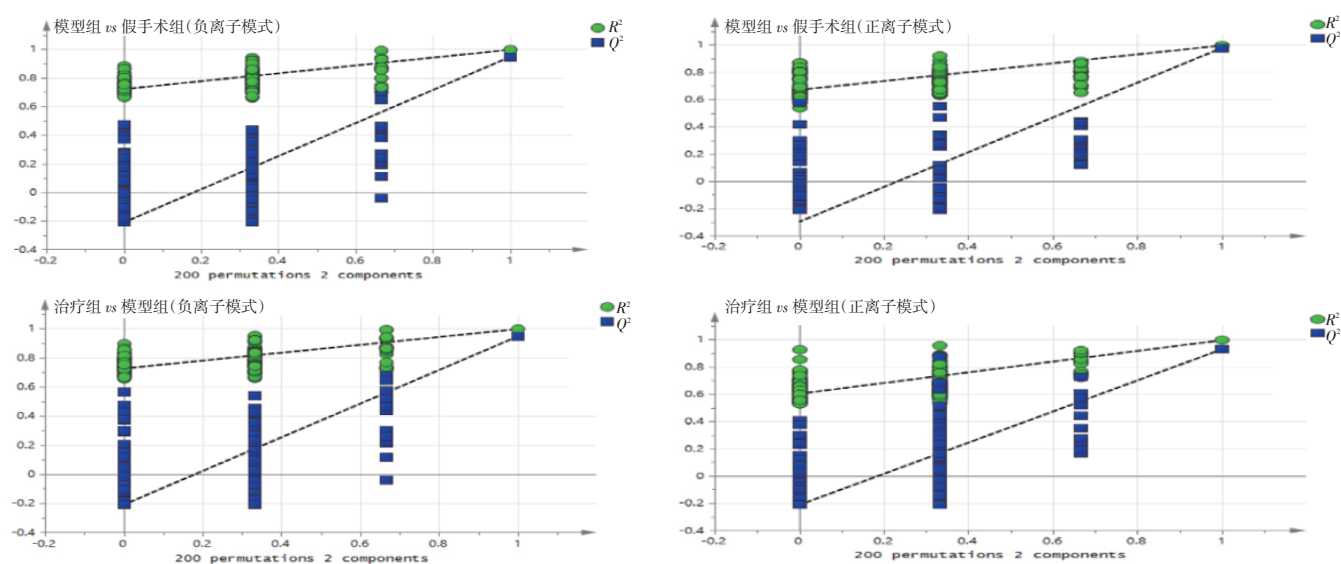


图 5 清热化痰通腑方干预卒中相关性肺炎大鼠血清代谢组的 OPLS-DA 置换检验结果

Figure 5 The results of OPLS-DA replacement test in serum metabolomics of rats with stroke-associated pneumonia treated with *Qingre Huatan Tongfu* decoction

酸、白三烯 B4、苯乙酰甘氨酸、磷酸丝氨酸、前列腺素 E2、前列腺素 F2 α 、血栓素 B2、11-脱氧皮质酮、19-氧睾酮、前列腺素 E3、前列腺素 F1 α 、油酸以及棕榈酸含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明, HTF 对 SAP 模型大鼠血清中的内源性生物标志物具有良好的回调作用。

2.6 潜在生物标志物代谢通路分析 将 22 个潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 数据库进行代谢通路分析, 结果共涉及 15 条代谢通路。当代谢通路的 Pathway impact > 0.01 时, 被认为此条通路与疾病密切相关^[12]。因此, 得到与 SAP 密切相关的代谢通路共 7 条, 分别为苯

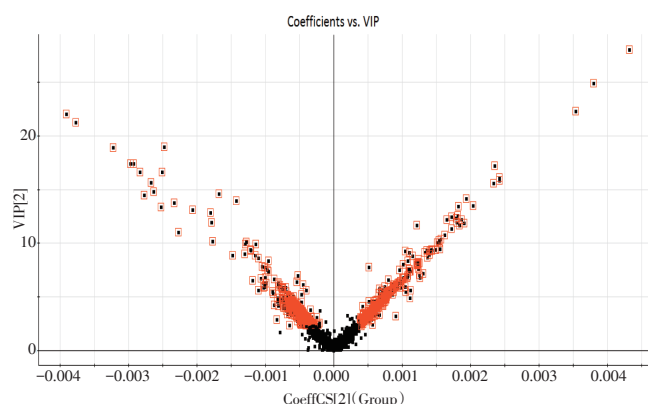


图6 清热化痰通腑方干预卒中相关性肺炎大鼠血清代谢物的VIP散点图

Figure 6 The VIP scatter diagram in serum metabonomics of rats with stroke-associated pneumonia treated with *Qingre Huatan Tongfu* decoction

丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)、柠檬酸循环[TCA循环, Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)]、脂肪酸生物合成(Fatty acid biosynthesis)、类固醇激素生物合成(Steroid hormone biosynthesis)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, serine and threonine metabolism), 结果见图8。

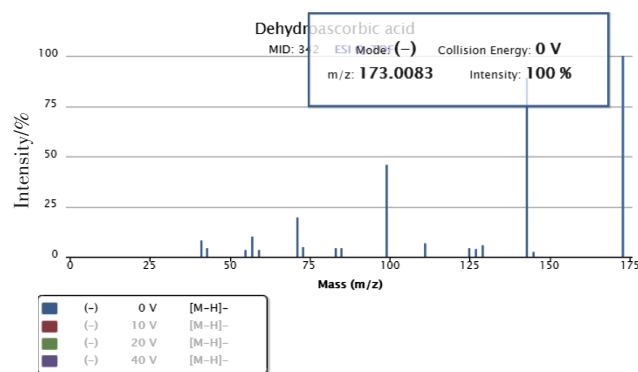


图7 潜在生物标志物顺乌头酸的鉴定示例

Figure 7 The identification example of potential biomarker cis-aconitic acid

3 讨论

本课题组前期研究表明, 改良线栓法结合气管注射铜绿假单胞菌法建立的卒中相关性肺炎(SAP)大鼠模型成功率高, 操作简便, 可重复性良好^[7]; 清热化痰通腑方(HTF)灌肠给药治疗 SAP 大鼠, 能够减轻脑、肺、肠各组织及全身炎症反应, 减轻脑水肿, 促进神经功能恢复, 其机制可能与其对血管活性肠肽(VIP)、P 物质(SP)的调节作用有关^[13]。本研究结果显示, SAP 模型组大鼠出现持续性高热, 被毛杂乱而无光泽, 生长速度减慢, 精神状态差, 鼻周有大量分泌物, 并伴有气喘等症状, 且神经功能缺损

表1 清热化痰通腑方对卒中相关性肺炎大鼠血清中潜在生物标志物的影响(正离子模式)

Table 1 The effect of *Qingre Huatan Tongfu* decoction on potential biomarkers in serum of rats with stroke-associated pneumonia (positive ion model)

编号	保留时间/min	m/z 值	分子式	化合物	HMDB ID	KEEG ID	模型组 vs 假手术组	治疗组 vs 模型组	代谢通路
1	4.120 4	212.018 5	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄	3-甲氧基-L-酪氨酸 (3-Methoxy-L-tyrosine)	-	-	↑ ^{**}	↓ ^{**}	-
2	3.473 5	190.084 5	C ₇ H ₁₁ NO ₅	N-乙酰谷氨酸 (N-Acetylglutamic acid)	0001138	C00624	↓ [#]	↑ ^{**}	尿素循环与氨基代谢
3	5.445 1	337.250 7	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	白三烯 B4(Leukotriene B4)	0001085	C02165	↑ ^{**}	↓ ^{**}	前列腺素和白三烯代谢, 神经活性配体-受体相互作用
4	1.425 0	194.079 6	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	苯乙酰甘氨酸 (Phenylacetylglutamine)	0000821	C05598	↑ ^{**}	↓ ^{**}	苯丙氨酸代谢
5	9.756 3	297.146 0	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	雌激素(Estrogen)	0001962	C07534	↓ ^{**}	↑ ^{**}	-
6	0.579 6	203.051 6	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	癸二酸(Sebacic acid)	0000792	C08277	↓ ^{**}	↑ ^{**}	-
7	1.144 5	202.045 9	C ₅ H ₈ NO ₃ P	磷酸丝氨酸(Phosphoserine)	0000272	C01005	↑ ^{**}	↓ ^{**}	半胱氨酸和蛋氨酸代谢
8	5.596 6	353.246 0	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	前列腺素 E2(Prostaglandin E2)	0001220	C00584	↑ ^{**}	↓ ^{**}	花生四烯酸代谢
9	4.822 1	355.261 5	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	前列腺素 F2α(Prostaglandin F2α)	0001139	C00639	↑ ^{**}	↓ ^{**}	-
10	5.601 2	228.194 5	C ₇ H ₁₃ N ₅ O ₄	脱氧胞苷(Deoxycytidine)	0000014	C00881	↓ ^{**}	↑ ^{**}	嘧啶代谢
11	5.596 8	371.257 0	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	血栓素 B2(Thromboxane B2)	0003252	C05963	↑ ^{**}	↓ ^{**}	前列腺素和白三烯代谢

注: 模型组与假手术组比较, [#]P < 0.05, ^{**}P < 0.01; 治疗组与模型组比较, ^{**}P < 0.01; ↑: 升高; ↓: 降低

表 2 清热化痰通腑方对卒中相关性肺炎大鼠血清中潜在生物标志物的影响(负离子模式)

Table 2 The effect of *Qingre Huatan Tongfu* decoction on potential biomarkers in serum of rats with stroke-associated pneumonia (negative ion model)

编号	保留时间/min	m/z 值	分子式	化合物	HMDB ID	KEEG ID	模型组 vs 假手术组	治疗组 vs 模型组	代谢通路
12	12.790 1	329.246 3	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	11-脱氧皮质酮 (11-deoxycorticosterone)	0000016	C03205	↑ ^{##}	↓ ^{**}	类固醇激素生物合成
13	12.543 3	303.233 6	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	19-氧睾酮(19-oxytestosterone)	0003959	C05295	↑ ^{##}	↓ ^{**}	雄激素和雌激素代谢组
14	4.759 2	242.174 0	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	胞苷(Cytidine)	0000089	C00475	↓ [#]	↑ ^{**}	嘧啶代谢
15	4.472 2	251.093 3	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	酪氨酸(Tyrosine)	0029098	-	↓ ^{##}	↑ ^{**}	-
16	0.913 2	172.989 1	C ₇ H ₁₀ O ₅	莽草酸(Shikimic acid)	0003070	C00493	↓ ^{##}	↑ ^{**}	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成
17	13.751 3	349.234 1	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	前列腺素 E3(Prostaglandin E3)	-	-	↑ [#]	↓ ^{**}	-
18	13.505 5	355.156 4	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	前列腺素 F1α(Prostaglandin F1α)	-	-	↑ ^{##}	↓ ^{**}	花生四烯酸代谢
19	0.912 4	172.989 1	C ₆ H ₆ O ₆	顺乌头酸(Aconitic acid)	0000072	C00417	↓ ^{##}	↑ ^{**}	柠檬酸循环(TCA 循环)
20	8.939 8	429.299 2	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	维生素 E(Vitamin E)	0001893	C02477	↓ [#]	↑ ^{**}	类固醇的生物合成
21	13.750 7	281.247 0	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸(Oleic acid)	0000207	C00712	↑ ^{##}	↓ ^{**}	脂肪酸生物合成
22	13.504 6	255.231 2	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸(Palmitic acid)	0000207	C00249	↑ ^{##}	↓ ^{**}	线粒体脂肪酸延长

注: 模型组与假手术组比较, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 治疗组与模型组比较, ^{**}*P* < 0.01。↑: 升高; ↓: 降低

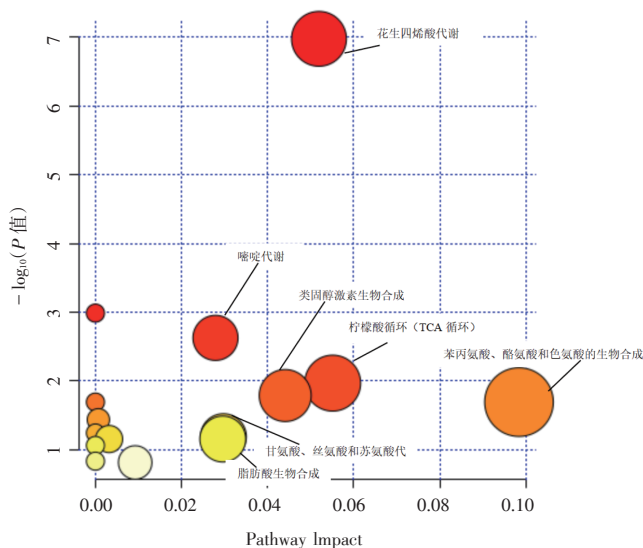


图 8 清热化痰通腑方干预卒中相关性肺炎大鼠的血清代谢通路分析

Figure 8 The analysis of serum metabolomics pathways in rats with stroke-associated pneumonia treated with *Qingre Huatan Tongfu* decoction

评分明显高于假手术组。进一步通过血清代谢组学分析发现, SAP 模型大鼠血清中共有 22 种内源性生物标志物发生显著变化, 而清热化痰通腑方(HTF)对这些差异代谢物水平具有明显回调作用。与 SAP 密切相关的通路共 7 条, 主要与花生四烯酸代谢、脂质代谢以及能量代谢等有关。

血栓素、白三烯和前列腺素由花生四烯酸经一系列途径转化而得。血栓素是一种强烈的血管收缩

剂, 具有血小板凝聚和血管收缩作用。血栓素 B2 可引起肺毛细血管内微循环以及肺血管痉挛, 严重破坏肺功能, 在呼吸窘迫综合征中发挥重要作用^[14]。急性脑梗死患者血浆中的血栓素含量明显增加^[15]。白三烯可增加毛细血管的渗透性, 是黏液分泌的强刺激剂。研究^[16]发现, 白三烯 B4 含量越高, 则脑梗死体积越大, 急性脑梗死的炎性反应越强。前列腺素 E2 可作为前炎症因子调节炎症反应过程中免疫细胞分化或上调细胞因子的表达, 发挥促炎作用^[17]。本研究结果显示, SAP 模型组大鼠血清中的血栓素 B2、白三烯 B4、前列腺素 F2α 及前列腺素 E2 含量明显升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01), 表明 SAP 大鼠体内的花生四烯酸代谢发生异常改变, 导致炎性物质的合成与分泌, 从而加重肺部炎症。而经 HTF 干预后, 治疗组大鼠血清中的上述物质含量均明显回调, 表明 HTF 可能通过干预花生四烯酸代谢通路而发挥抗炎作用。

有研究^[18]表明, 棕榈酸是脑卒中的高危因素之一。本研究结果显示, SAP 模型组大鼠血清中的棕榈酸含量显著升高(*P* < 0.01), 而治疗组大鼠的棕榈酸水平明显降低(*P* < 0.01), 表明 SAP 大鼠体内的硬脂酸代谢出现异常, 而 HTF 能够对其血清棕榈酸水平具有回调作用, 使之趋于正常。

莽草酸具有抗炎、抑制血小板聚集和抗脑血栓形成的作用, 参与花生四烯酸代谢和脂质代谢。研究^[19]发现, 莽草酸可通过降低大脑中动脉缺血再灌注模

型大鼠脑组织中的髓过氧化物酶(MPO)活性,减少白细胞浸润,发挥对局灶性脑缺血的保护作用。本研究结果显示,SAP模型组大鼠血清中的莽草酸含量水平明显降低($P < 0.01$),表明其体内的脂质代谢出现异常。而HTF干预可能通过回调莽草酸水平,影响脂质代谢,从而发挥减轻肺部炎症反应及保护脑组织的作用。

柠檬酸是生物体内三羧酸循环中的主要物质之一,而三羧酸循环是需氧生物体内普遍存在的代谢途径,是机体获取能量的主要方式^[20]。在生物体内顺乌头酸是柠檬酸在乌头酸酶(定位在线粒体内)作用下异构化生成异柠檬酸的中间产物。本研究结果显示,SAP模型组大鼠血清中的顺乌头酸水平显著下降($P < 0.01$),而经HTF干预后,治疗组大鼠的顺乌头酸水平明显升高($P < 0.01$)。结果表明,HTF可能通过回调SAP大鼠体内顺乌头酸的水平来影响三羧酸循环代谢,从而提供能量,增强SAP大鼠的免疫功能,减轻炎症反应。

胞苷是合成核糖核酸与脱氧核糖核酸的重要前体物质,能参与机体的一系列生物反应。本研究结果显示,SAP模型组大鼠血清中的胞苷含量明显降低($P < 0.05$),从而影响嘧啶代谢,阻碍核糖核酸与脱氧核糖核酸合成。而经HTF干预后,治疗组大鼠的胞苷水平显著升高($P < 0.01$),结果表明HTF能够逆转SAP大鼠的嘧啶代谢紊乱。

综上所述,SAP模型大鼠体内多条代谢通路发生异常改变,HTF灌肠给药后能够减轻SAP大鼠脑、肺组织炎症反应,促进神经功能恢复,其机制可能与通过回调模型大鼠血清中多种内源性差异代谢物的水平,调节花生四烯酸代谢、脂质代谢以及能量代谢等有关。另外,本研究结果也可为HTF抗SAP组织炎症反应的潜在分子机制研究提供参考。

参考文献:

- [1] MCMURRAY J J V, EZEKOWITZ J A, LEWIS B S, et al. Left ventricular systolic dysfunction, heart failure, and the risk of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation: insights from the aristotle trial[J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(3): 451-460.
- [2] 吕军影, 黄李平教授治疗脑病并发肺部感染学术经验及临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
- [3] 宋苹, 张溪, 姚怀国. 卒中相关性肺炎的中医症状及证型特征[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(9): 1557-1560.
- [4] 吴珊. 清热化痰通腑方直肠滴注治疗脑病意识障碍患者的临床研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2015.
- [5] 吕军影, 李凯, 黄李平, 等. 清热化痰通腑方直肠滴注治疗脑病并发肺部感染的疗效[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(6): 1005-1007.
- [6] 农菲菲, 罗爽, 赵钟祥, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术的大黄牡丹汤治疗IBD大鼠的血清代谢组学研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(5): 571-579.
- [7] 郑雪嘉, 吕军影, 李凯, 等. 脑梗死合并细菌性肺炎大鼠模型的建立与评价[J]. *广西医科大学学报*, 2017, 34(4): 504-509.
- [8] 崔景军, 何娇君, 李晶, 等. 大鼠大脑中动脉梗死模型的评价标准探讨[J]. *天津中医药*, 2013, 30(1): 33-35.
- [9] 黄亚平, 胡克, 雷琳, 等. 脑梗死合并肺部感染临床动物模型的制作[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(06): 1256-1258.
- [10] MEERS P, NEVILLE M, MALININ V, et al. Biofilm penetration, triggered release and *in vivo* activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(4): 859-868.
- [11] 郑雪嘉. 清热化痰通腑方灌肠对脑梗死合并细菌性肺炎大鼠IL-6和神经肽VIP、SP的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [12] XIA J, WISHART D S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis[J]. *Current Protocols Bioinformatics*, 2016, 55(1): 14.
- [13] 赵亮娟, 郑雪嘉, 吕军影, 等. 清热化痰通腑方灌肠对脑梗死合并细菌性肺炎模型大鼠脑、肺、肠组织神经肽的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(10): 1604-1611.
- [14] 贺岚. 血必净注射液联合大剂量氨溴索治疗重症肺炎合并急性呼吸窘迫综合征的疗效及对血浆TXB2、ET-1、IL-8表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(36): 4023-4025.
- [15] LIPPI G, ALOEE R, DIPALO M, et al. Combination of copeptin and highly sensitive troponin I for diagnosing acute myocardial infarction at emergency department admission[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(3/4): 357-358.
- [16] 方美凤, 谭峰, 王学文. 细胞因子信号转导抑制因子3和白三烯B4及白细胞介素6与脑梗死体积的相关性[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018, 20(10): 1095-1096.
- [17] 陶迎秋, 梁统, 周克元, 等. 花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用[J]. *国际免疫学杂志*, 2010, 33(4): 303-306.
- [18] 刘青, 叶鹏. 载脂蛋白E及脂肪酸与脑卒中、冠状动脉粥样硬化性心脏病、死亡风险的关系[J]. *中华高血压杂志*, 2018, 26(11): 1066.
- [19] 孙文燕, 孙建宁, 刘振权, 等. 异亚丙基莽草酸对大鼠中动脉缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2005, 28(3): 34-37.
- [20] 李慧, 吴艳华, 陈宝田, 等. 偏头痛大鼠的尿液代谢组学研究[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(7): 506-509.

(编辑: 邹元平)