

基于代谢组学的苓百清肺浓缩丸治疗支原体肺炎小鼠的作用机制研究

魏文峰, 刘 烨, 霍金海, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要: **目的** 研究苓百清肺浓缩丸治疗支原体肺炎的作用机制。 **方法** 采用超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 联用技术的代谢组学方法, 分析肺炎支原体感染小鼠肺组织中内源性化合物的变化。采用 Progenesis QI 软件进行色谱峰识别及匹配, 并采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA) 对获得数据进行降维, 通过分析对不同组间分离贡献度较大 ($VIP > 1$, $P < 0.05$) 化合物的串联质谱数据, 经 HMDB 等数据库检索, 确定潜在生物标志物。 **结果** 从肺组织中共鉴定出视黄醛、全反式维甲酸、焦谷氨酸、白三烯 C₄、维生素 A、花生四烯酸、前列腺素 I₂ 等 20 个潜在生物标志物。与模型组比较, 苓百清肺浓缩丸对 20 个潜在生物标志物均具有回调作用。 **结论** 苓百清肺浓缩丸通过影响视黄醇代谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢等通路发挥治疗支原体肺炎的作用。

关键词: 苓百清肺浓缩丸; 肺炎支原体; 代谢组学; 主成分分析; 偏最小二乘-判别分析

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5211-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.024

Study on mechanism of Qinbai Qingfei Concentrated Pellets in treatment of mycoplasma pneumonia mice model based on metabolomics

WEI Wen-feng, LIU Ye, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of Qinbai Qingfei Concentrated Pellets (QQCP) in the treatment of mycoplasma pneumonia pneumonia. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was applied to detect the change of endogenous substances in the lung tissue of mycoplasma pneumonia mice model after taking decoction of QQCP orally. Progenesis QI was adopted to identify and match the peak, and principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to reduce data dimension. Through the analysis of tandem mass spectrum data of compound that had larger contribution to the separation among different groups ($VIP > 1$, $P < 0.05$) and the HMDB database retrieval to identify potential biomarkers. **Results** Twenty potential biomarkers were identified from lung tissue as retinal, all-trans-retinoic acid, pyroglutamic acid, leukotriene C₄, vitamin A, arachidonic acid, and prostaglandin I₂. Compared with model group, QQCP group had callback function of 20 potential biomarkers. **Conclusion** QQCP play a role of treatment for mycoplasma pneumonia by affecting retinol metabolism, linoleic acid, and arachidonic acid metabolism. These results indicated that QQCP had the characteristics of multi-pathway, multi-target and overall regulation in the treatment of mycoplasma pneumonia pneumonia.

Key words: Qinbai Qingfei Concentrated Pellets; mycoplasma pneumonia; metabolomics; PCA; PLS-DA

肺炎支原体 (mycoplasma pneumonia, MP) 是引起人类呼吸道感染的重要病原体之一, 儿童感染率更高, 西方国家早已将支原体列为 5 岁以上儿童肺炎的主要病原体。小儿的肺结构发育不完善, 经过反复感染后, 极易受损^[1]。目前临床治疗应用大环内酯

类抗生素, 以杀灭支原体为主, 长期或反复使用不良反应大、副作用强, 并且耐药率逐年上升^[2-3]。临床上尚缺乏既能杀灭支原体又能提高免疫功能的药物。

苓百清肺浓缩丸 (QQCP) 由黄芩、百部、桔

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81374045); 黑龙江省应用技术与开发计划 (PB15F005); 哈尔滨市青年科技创新人才基金项目 (2016RAQYJ198)

作者简介: 魏文峰 (1984—), 助理研究员, 研究方向为中药化学成分分析及药物代谢研究。Tel: (0451)55653086-6902 E-mail: wenfeng0831@163.com

*通信作者 王伟明, 研究员。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

梗、地龙、麦冬、紫菀 6 味药组成,是国家食品药品监督管理局批准的第 1 个用于临床治疗小儿肺炎支原体肺炎 (mycoplasmal pneumoniae pneumonia, MPP) 的中药新药,具有清热解毒、润肺止咳的功效。前期研究表明其具有良好的抗支原体作用^[4-5],能够提高机体免疫功能^[6],并促进肺上皮细胞修复^[7],但其对于 MPP 的作用机制尚不明确。代谢组学从整体观出发,以机体代谢物组变化为载体,以时空动态性和全局性观点全面解析疾病对机体的影响^[8]。本研究采用 MP 感染小鼠模型,通过病理切片观察及支原体定量检测验证 QQCP 抗 MPP 的作用。采用基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的代谢组学方法对小鼠肺组织中内源性代谢物的变化进行分析,从代谢组学的角度阐明 QQCP 治疗 MPP 的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY™ UPLC 液相色谱仪、Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 购于美国 Waters 公司; AB Sciex 5600+ 型质谱仪 (美国 AB Sciex 公司)。

1.2 试药

QQCP (哈尔滨天合力制药有限公司,批号 150901),为棕褐色的薄膜包衣浓缩水丸,经检测符合《中国药典》2015 年版丸剂下的各项规定。阿奇霉素 (批号 20150401,大连辉瑞制药有限公司)。

1.3 试剂

MP 国际标准菌株 FH (ATCC15531,美国菌种保藏中心); PPLO 培养基 (碧迪医疗器械有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱级, Merck 公司); 甲酸 (色谱级, Thermo Scientific 公司); 屈臣氏蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.4 实验动物

BALB/c 雄性小鼠 40 只,清洁级,体质量 (20±2) g,北京维通利华实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK (京) 2012-001。饲养于黑龙江中医药科学院动物实验中心,环境温度 (20±2) °C,相对湿度 (50±20) %。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

MP 培养参见文献方法^[9]。将 40 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组,分别为对照组、模型组、QQCP 组和阳性对照组 (阿奇霉素组),每组 10 只,MP 感染小鼠模型的制备参见文献方法^[10]。感染后第 2

天 ig 给药,每日 1 次,对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,阳性对照组按照 32.5 mg/kg ig 阿奇霉素,QQCP 组按照 2.3 g/kg 剂量 (相当于人体临床每日等效剂量) 连续给药 14 d。各组小鼠末次给药 2 h 后 1%戊巴比妥钠麻醉,眼眶后静脉丛取血,分离血清,−80 °C 冻存。剪取肺组织,称定质量后取左肺组织以 4%甲醛固定,用以 HE 染色;取右肺组织用于代谢组学分析。

2.2 样品预处理

取已固定左肺组织,乙醇梯度脱水,二甲苯透明 2 次,石蜡包埋,切片,HE 染色,在显微镜下进行 MP 特异性病变间质性肺炎的病理学检查。

取 100 mg 右肺组织,加 1 mL 超纯水匀浆 3 min,加入 4 mL 在 4 °C 下预冷的甲醇涡旋 2 min,超声 2 min,静置 10 min 后取上清液,4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,室温下氮气吹干,加 200 μL 甲醇复溶,在 4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样 3 μL,供超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 分析。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 样品仓温度 4 °C; 进样量 3 μL; 洗脱梯度: 0~3 min, 95%~40% A; 3~4 min, 40% A; 4~9 min, 40%~0 A; 色谱仪流出液不分流直接注入质谱仪进行正、负离子扫描检测。

2.3.2 质谱条件 采用 ESI 离子源,离子化模式为电喷雾正、负离子模式,正、负离子源电压分别为 5 500 V/−4 500 V,离子源温度为 550 °C,雾化气体为 N₂,雾化气 (Gas1) 为 379.2 kPa,辅助气 (Gas2) 为 379.2 kPa,气帘气 (Curtain gas) 为 241.3 kPa,裂解电压 (DP) 分别为 80 V/−80 V,碰撞能量 (CE) 分别为 35 eV/−35 eV,碰撞能量扩展 (CES) 均为 15 eV。TOF MS 扫描范围: 80~1 500; Product Ion 扫描范围 50~1 500。扫描方式: IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描,并开启动态背景扣除 (DBS)。数据采集软件为 Analyst TF 1.6 software 工作站; 采用 CDS 质量校正系统在线校正。

2.4 质控 (QC) 样本的检测

为保证整个分析系统的稳定性,采用 QC 样品进行方法验证。QC 样品是由每个样品各取 100 μL

混合而得, 为降低误差, 样品检测为随机进行。在对样品分析前, 先运行 5 次 QC 样品以平衡系统, 在样品的检测过程中, 每检测 5 个实验样品后运行 1 次 QC 样品, 以衡量系统的稳定性。

2.5 数据处理

采用 Analyst TF 1.6 软件进行色谱采集, 对 UPLC-Q-TOF-MS 检测得到的数据导入 Progenesis QI 软件进行峰匹配、峰提取、标准化、数据降维和质谱矩阵信息获取。进一步利用 EZinfo 软件模块对每组数据进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA), 以 OPLS-DA 模型中第 1 主成分的 VIP (variable importance in the projection) 值 (>1), 结合 t 检验的 P 值 (<0.05) 来寻找差异性表达代谢物, 结合公共网络数据库 (HMDB、Metlin) 检索, 对代谢物进行结构鉴定, 通过代谢途径数据库 KEGG 和 Metabo Analyst 检索, 结合相关文献、生物化学及分子生物学知识, 探讨潜在生物标志物的相关生物学意义。

3 结果

3.1 小鼠肺组织病理变化

小鼠肺组织病理切片评分系统由 1 个 0~26 分的评分系统组成^[11], 5 个分类评价系统由管腔周围浸润而致的细支气管和支气管的数目、管腔周围浸润的程度、管腔内渗出的严重度、血管周围浸润的频度、实质性肺炎的严重度合并后记分, 每张切片选择 5 个视野评分。对照组小鼠肺组织可见肺泡结构清晰, 肺泡

壁薄, 未见炎性细胞浸润, 上皮细胞状态良好 (图 1、表 1); 模型组小鼠肺组织支气管形态中度改变, 管腔有大量分泌物, 肺泡上皮坏死, 边缘模糊, 肺泡壁增厚、水肿、脱落, 气管支气管周围及其腔内、血管周围及肺泡腔内伴以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 病变面积较大; QQCP 组小鼠肺组织支气管症状明显改善, 上皮细胞恢复良好, 肺泡水肿减轻, 边缘逐步清晰, 病变面积明显减少; 阿奇霉素组小鼠肺组织支气管症状轻微改善, 整体未见明显改善。

3.2 代谢组学研究

3.2.1 小鼠肺组织代谢轮廓分析 采用 UPLC-Q-TOF-MS 法进行肺组织样本的分离与数据采集, 并对数据进行 PCA 和 PLS-DA, PCA 在正、负离子模式下的得分图见图 2, 经建模后, 模型组小鼠肺组织中的内源性代谢物与对照组相比发生了明显的变化, 经 QQCP 治疗后, 代谢轮廓向着对照组方向改变。

3.2.2 潜在生物标志物的表征 为进一步区分各组差异, 对对照组、模型组和 QQCP 组小鼠肺组织代谢物进行有监督的 PLS-DA, 正离子模式的模型参数为 $R^2=0.96$, $Q^2=0.92$, 负离子模式参数为 $R^2=0.92$, $Q^2=0.88$, 结果见图 3。结果显示所构建模型有效, 可用于后续组间差异成分的寻找及分析。从图 3 中可以看出模型组与对照组具有很好的区分, 负离子模式下 QQCP 组与对照组极为接近并有部分重叠。通过 VIP 值并结合 t 检验 ($P<0.05$) 寻找差异性表达代谢物, 得到 20 个差异生物标志物 (表 2、3)。

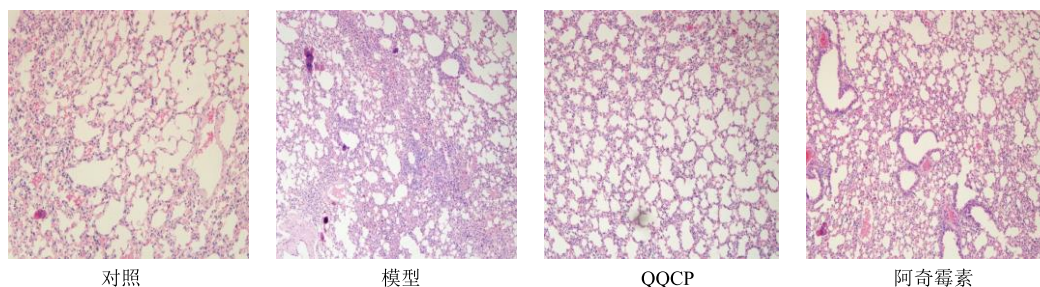


图 1 各组小鼠肺组织病理学观察结果 ($\times 10$, HE)

Fig. 1 Pathological detection of lung tissue of mice in each group ($\times 10$, HE)

表 1 各组小鼠肺组织病理评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Histological score of lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	支气管	肺泡组织	血管	病变面积	总分
对照	0.50 ± 0.97	2.60 ± 2.50	0.80 ± 0.92	0.88 ± 1.11	4.78 ± 4.96
模型	$3.20 \pm 1.62^{##}$	4.20 ± 3.16	$2.00 \pm 1.63^{\#}$	$2.85 \pm 1.96^{\#}$	$12.30 \pm 7.37^{##}$
QQCP	$0.50 \pm 0.71^{**}$	3.20 ± 1.62	1.20 ± 0.79	$1.90 \pm 1.20^*$	$6.80 \pm 3.71^{**}$
阿奇霉素	2.30 ± 1.95	5.30 ± 3.50	1.20 ± 0.92	2.25 ± 1.52	10.10 ± 6.25

与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$

$^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group

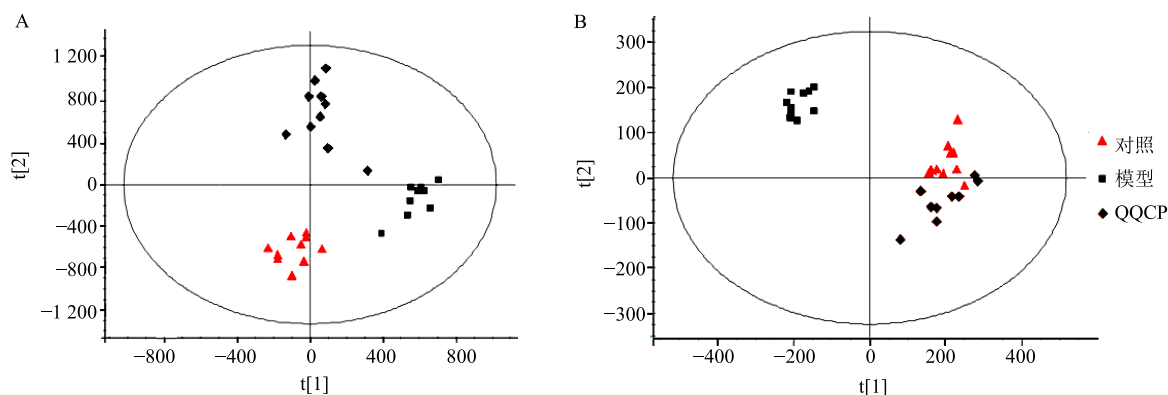


图 2 对照、模型和 QQCP 组小鼠肺组织正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 代谢轮廓 PCA 得分

Fig. 2 PCA score plots of lung tissue metabolic profiling of control group, model group, and QQCP group in positive mode (A) and negative mode (B)

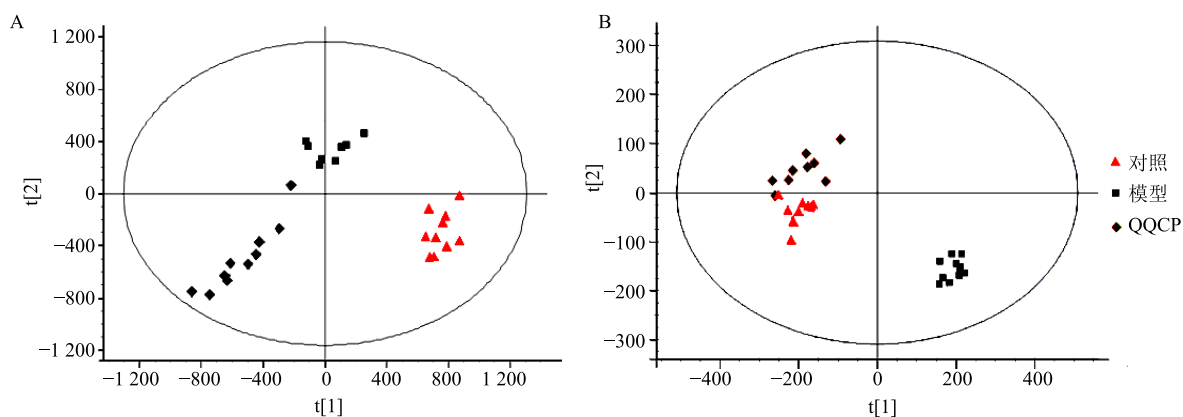


图 3 对照、模型和 QQCP 组小鼠肺组织正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 代谢轮廓 PLS-DA 得分

Fig. 3 PLS-DA score plots of lung tissue metabolic profiling of control group, model group and QQCP group in positive mode (A) and negative mode (B)

表 2 QQCP 治疗小鼠 MPP 的潜在生物标志物 (正离子模式)

Table 2 Potential biomarkers in MPP mice treated by QQCP (positive mode)

序号	t_R/min	m/z	分子式	潜在标志物	变化趋势	
					模型	QQCP
1	3.64	353.232 5	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$	前列腺素 I_2	↓##	↑*
2	3.65	317.211 2	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$	4-羟基维 A 酸	↓##	↑*
3	4.81	583.254 1	$\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$	胆绿素	↓#	↑
4	6.78	301.216 2	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$	全反式维甲酸	↑##	↓
5	7.65	285.221 1	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$	视黄醛	↑##	↓
6	7.66	303.232 1	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	视黄酯	↑##	↓
7	11.49	287.236 6	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	维生素 A	↓##	↑*
8	11.49	305.247 7	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	花生四烯酸	↓##	↑*
9	11.77	281.247 4	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	亚油酸	↓##	↑**
10	12.18	307.263 2	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$	8,11,14-二十碳三烯酸	↓##	↑**

与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; ↑上调 ↓下调, 下同

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ↑upregulation ↓downregulation, same as below

表 3 QQCP 治疗小鼠 MPP 的潜在生物标志物 (负离子模式)

Table 3 Potential biomarkers in MPP mice treated by QQCP (negative mode)

序号	t_R/min	m/z	分子式	潜在标志物	变化趋势	
					模型	QQCP
11	0.84	145.062 6	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	左旋谷酰胺	↑ ^{##}	↓
12	1.01	259.022 7	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$	半乳糖 1-磷酸盐	↑ [#]	↓ [*]
13	1.21	128.035 7	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	焦谷氨酸	↑ [#]	↓ ^{**}
14	4.30	351.217 6	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$	20-羟基-白三烯 B4	↑ ^{##}	↓
15	4.38	624.296 8	$\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$	白三烯 C4	↑ ^{##}	↓ [*]
16	4.67	353.233 2	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$	前列腺素 F _{2a}	↓ ^{##}	↑ ^{**}
17	5.01	353.233 1	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$	11,12,15-三羟基二十烷酸	↓ ^{##}	↑ ^{**}
18	7.65	351.217 6	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$	前列腺素 E2	↑ ^{##}	↓
19	7.67	319.227 9	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$	5,6-环氧-8,11,14-二十碳三烯酸	↑ ^{##}	↓ ^{**}
20	11.50	335.222 7	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$	白三烯 B4	↓ ^{##}	↑ ^{**}

与对照组比较,模型组小鼠肺组织中维 A 酸、视黄醛、焦谷氨酸、白三烯 C4、前列腺素 E2 等 10 个潜在标志物水平升高,而胆绿素、花生四烯酸、亚油酸、11,12,15-THETA 等 10 个潜在标志物水平下降,给予 QQCP 治疗后,20 个潜在生物标志物水平均得到了不同程度的回调,其中亚油酸、白三烯 B4 等 4 个潜在标志物水平与模型组相比显著升高,焦谷氨酸、5,6-环氧-8,11,14-廿碳三烯酸水平显著降低。

3.2.3 潜在生物标志物的生物学意义阐释 亚油酸是 1 种功能性的多不饱和脂肪酸,具有增强机体免疫功能的作用,主要表现在增加机体非特异性抗体的产生,提高淋巴细胞的增殖,增强吞噬细胞的吞噬能力。亚油酸能提高鼠肠淋巴结和脾淋巴细胞分泌 IgG、IgA 和 IgM 的量^[12],降低炎症细胞因子的释放,特别是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。本研究结果显示模型组小鼠肺组织中亚油酸水平降低,提示 MPP 可引起亚油酸量降低,影响免疫球蛋白的表达,使免疫力降低,炎症因子释放增加,炎症反应扩大。QQCP 组与模型组相比亚油酸水平显著升高,提示 QQCP 在增强免疫力、减轻炎症反应方面发挥了作用。

花生四烯酸是人体必需的游离脂肪酸之一。花生四烯酸可通过环氧化酶途径和脂氧化酶途径分别代谢为前列腺素、血栓素和白三烯 2 种代谢产物。花生四烯酸及其代谢产物在预防呼吸道疾病、调节免疫、抗炎方面发挥着至关重要的作用^[13]。本研究中,模型组小鼠肺组织中花生四烯酸水平降低,提示 MPP 可引起花生四烯酸水平下降,其代谢物白三烯水平升高进而导致支气管平滑肌收缩,使气道狭窄甚至阻塞。

QQCP 治疗后小鼠肺组织中花生四烯酸水平显著升高,白三烯水平降低,说明 QQCP 可缓解气管平滑肌收缩,减少气道狭窄,从而发挥治疗 MPP 的作用。

维生素 A 与视黄醇代谢通路有关,对维持视觉并促进机体生长发育有重要作用,还可增强机体的免疫反应,增加淋巴细胞与肺泡巨噬细胞浸润,并对肺泡上皮与气道上皮有明显的保护作用^[14]。视黄醇代谢通路紊乱、维生素 A 水平降低会直接影响胸腺上皮细胞角蛋白的形成,进而影响到免疫细胞的发育,导致机体免疫功能下降^[15]。另外,维生素 A 的缺乏会使气管、支气管上皮细胞发育受阻,细胞脱落,气道上皮完整性遭到破坏。本研究中,模型组小鼠肺组织中维生素 A 水平降低,提示 MPP 可引起维生素 A 水平下降,进而导致气道上皮完整性破坏和机体免疫功能下降。QQCP 治疗后小鼠肺组织中维生素 A 升高,说明 QQCP 可通过保护气道上皮细胞、提高机体免疫功能发挥治疗 MPP 作用。

4 结论

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合 PCA、PLS-DA 手段,进行了 QQCP 治疗 MP 肺组织代谢组学研究,分析鉴定了 20 种潜在生物标志物,其中正离子模式下 10 种,负离子模式下 10 种。这些生物标志物主要涉及 9 条代谢通路,说明 QQCP 通过影响视黄醇、亚油酸、花生四烯酸代谢等各途径发挥治疗作用。从各生物标志物的回归趋势及相关生物功能分析表明,QQCP 具有良好的治疗 MPP 的作用,能够从整体上纠正代谢轮廓的改变,体现了 QQCP 治疗 MPP 的多途径、多靶点、整体调节的作用特点。

参考文献

- [1] Park S J, Pai K S, Kim A R, *et al.* Fulminant and fatal multiple organ failure in a 12-year-old boy with mycoplasma pneumoniae infection [J]. *Alergy Asthma Immunol Res*, 2012, 4(1): 55-57.
- [2] 马晓丽, 郑跃杰. 肺炎支原体对大环内酯类药物耐药研究 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(6): 596-597.
- [3] 朱美君, 徐明, 宋磊, 等. 2013-2015年南通市第一人民医院儿童肺炎支原体感染病原菌的分布及耐药性分析 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 709-712.
- [4] 王伟明, 张俊威, 许庆瑞, 等. 芩白浓缩丸体内外抗肺炎支原体作用的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 742-745.
- [5] 蒙艳丽, 王欣, 王伟明. 芩白清肺浓缩丸对肺炎支原体作用 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 36-39.
- [6] 李继昌, 王伟明, 张洪娟, 等. 呼畅清肺浓缩丸对肺炎支原体感染鼠免疫功能影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 366-368.
- [7] Meng Y L, Huo J H, Lu W H, *et al.* Modulation of p1 and EGF expression by baicalin [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 146-157.
- [8] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. "Metabonomics" understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [9] Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestation of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia [J]. *J Infect Chemother*, 2010, 16(3): 162-169.
- [10] 魏文峰, 褚衍涛, 刘焯, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱技术的肺炎支原体感染小鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1382-1389.
- [11] Martin R J, Chu H W, Honour J M. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(5): 577-582.
- [12] Laiakis E C, Morris G A, Fornace A J, *et al.* Metabolomic analysis in severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa: Findings from a pilot study [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12655.
- [13] Schiffer L, Anderko S, Hobler A, *et al.* A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale [J]. *Microb Cell Fact*, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0209-5.
- [14] Medeiros S R, Pinheiro-Rosa N, Lemos L, *et al.* Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺T cells in mice [J]. *Nutrition*, 2015, 31(10): 1260-1265.
- [15] 楼皖玲, 潘家华, 刘辉, 等. 维生素A缺乏大鼠致敏后免疫功能低下对肺炎的影响机制 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(5): 552-556.