

基于 GC-MS 的金欣口服液对 RSV 肺炎小鼠脾脏代谢物的调控作用

孟 欣, 汪受传, 单进军, 徐建亚, 沈存思, 谢 彤*

南京中医药大学, 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要:目的 通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析呼吸道合胞病毒(RSV)感染小鼠脾脏组织中内源性代谢物的变化,探讨金欣口服液治疗 RSV 肺炎可能的作用机制。方法 RSV 滴鼻感染 BALB/c 小鼠建立 RSV 肺炎模型,给予金欣口服液(27.6 g/kg)干预治疗,连续治疗 7 d 后处死小鼠,取脾脏组织,经甲醇提取后,先后予甲氧胺吡啶和 BSTFA 以脗化和衍生化,然后运用 GC-MS 检测脾脏中所含有的代谢物及其相对量的变化。结果 RSV 肺炎小鼠的脾脏中共鉴定出 35 种代谢产物,其中 L-脯氨酸、L-谷氨酸、缬氨酸、尿素、次黄嘌呤、葡萄糖为具有显著性差异的代谢物($P < 0.05$),与之相关的代谢通路为 D-谷氨酰胺和谷氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢。结论 金欣口服液可以调节 RSV 肺炎小鼠脾脏的免疫功能,可能与氨基酸代谢有关。

关键词: 金欣口服液; 气相色谱-质谱联用; 脾脏; 呼吸道合胞病毒肺炎; 代谢物; 代谢组学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)24-4408-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.019

Regulation of Jinxin Oral Liquid on metabolites in spleen of mice with RSV pneumonia based on GC-MS

MENG Xin, WANG Shou-chuan, SHAN Jin-jun, XU Jian-ya, SHEN Cun-si, XIE Tong

Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To detect the relative abundance changes of metabolites in spleen to explore the antiviral effect of Jinxin Oral Liquid (JOL) against RSV pneumonia by GC-MS technology. **Methods** BALB/c mice were challenged intranasally to establish the RSV pneumonia models and administered with JOL (27.6 g·kg⁻¹·d⁻¹). After treated for 7 d, mice spleens were collected respectively. Metabolites were extracted by methanol, and then oximated, derevativized, and detected by GC-MS. **Results** 35 metabolites in spleen were identified, among which L-proline, L-glutamic acid, valine, urea, hypoxanthine, glucose were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Anti-RSV infection of JOL may be associated closely with the regulation of immune function of mice spleen, and amino acid metabolism is involved.

Key words: Jinxin Oral Liquid; GC-MS; spleen; RSV pneumonia; metabolites; metabonomics

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是导致婴幼儿急性下呼吸道感染重要的病原体之一,严重危害患儿的健康。著名中医儿科专家汪受传教授认为 RSV 肺炎当治以开肺解毒化痰^[1],在麻杏石甘汤的基础上灵活加减,自拟金欣口服液,疗效显著^[2-3]。

RSV 作为特异性抗原,侵袭机体后,导致体液免疫和细胞免疫紊乱。脾脏是机体内重要的免疫器官,直接参与调节免疫功能,与病毒感染密切相关。王克林等^[4]发现流感病毒感染小鼠急性期脾脏

质量减轻,脾淋巴细胞增殖反应受到抑制;李旭芳等^[5]研究巨细胞病毒感染对小鼠脾脏 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化的影响发现,上调 Th1 细胞分化比例,并诱导 Th2 细胞分化。杜丽娜等^[6]发现 RSV 感染可能导致小鼠的脾脏萎缩,金欣口服液可以一定程度上减轻脾脏的萎缩,从而提高机体免疫功能。此外,清肺口服液可以有效上调 RSV 肺炎小鼠的脾脏中 TH1 表达,下调 TH2 表达,使 TH1/TH2 水平下降,从而抑制相关炎症因子产生,减轻炎症反应^[7-8]。

收稿日期: 2016-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373688, 81303295); 江苏省研究生培养创新工程(SJZZ15_0120)

*通信作者 谢 彤(1985—),女,助理研究员,从事药理学及代谢组学方面的研究。

Tel: (025)85811330 E-mail: sunnyxy11021@163.com

气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)是一种高效的分析技术,利用气相色谱的高分离能力和质谱的高鉴别特性,具有灵敏度高、分析速度快、鉴别能力强等特点,并具备较成熟的质谱数据库,采用适当的衍生化处理方法后,对复杂的生物样本可以进行有效的定性定量分析,且操作简便,已成为联用技术中应用最广泛、发展最完善的仪器之一。本实验运用GC-MS技术检测分析BALB/c小鼠脾脏内代谢物,通过治疗前后其相对量的变化,探讨金欣口服液的作用机制,以期进一步为临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞、病毒与动物

人喉癌上皮细胞(Hep-2),由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。RSV A亚型(Long株),由武汉国家典型培养物保藏中心提供。SPF级BALB/c小鼠32只,雌性,体质量16~18 g,周龄为4~6周,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,使用许可证号SCXK(京)2012-0001。

1.2 主要仪器

Airstream® A2型二级生物安全柜(新加坡Esco公司);DMIL型倒置显微镜(德国Leica公司);MCO-20型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);MiniSpin面包式离心机(德国Eppendorf公司);Allegra64R高速冷冻离心机(美国Beckman公司);Savant SPD1010真空离心浓缩仪;Trace1310/TSQ8000气相色谱-质谱联用仪;TG-5MS毛细管色谱柱(美国Thermo公司)。

1.3 试剂与药品

高糖改良杜氏伊格尔培养基(DMEM)、0.25%胰酶(含乙二胺四乙酸)、优级胎牛血清(加拿大Wisent公司);甲醇(批号1774807513,质量分数≥99.9%,德国Merck公司);正己烷(批号SZBE1070V,质量分数≥99%),吡啶(批号PE202178,美国Thermo公司);甲氧铵盐(批号BCBN2932V)、含1%三甲基一氯硅烷(TMCS)的*N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA,批号BCBN4326V)、C₈~C₄₀烷烃混标(批号1408653V)、1,2-¹³C肉蔻酸(批号SH2326V,德国Sigma-Aldrich公司,内标);*L*-天冬氨酸(批号LCA0M32,质量分数98%)、*L*-谷氨酸(批号LT90M31,质量分数99%)、甘氨酸(批号L410N21,质量分数98%)等对照品(中国J&K百灵威公司)。

金欣口服液(浸膏):由炙麻黄3 g、苦杏仁10 g、生石膏20 g、葶苈子10 g、黄芩6 g、前胡10 g、桑白皮10 g、虎杖12 g组成。本实验所用金欣口服液由南京中医药大学植物药与新药开发研究中心(江苏省植物药深加工工程中心)制备与质控,将上方按比例取药,用10倍量水浸泡药材30 min,大火煮沸后再用小火煎煮30 min,倒出药汁,药材中再加入8倍量水依上法煎煮,合并2次药汁,用旋转蒸发仪低压浓缩至质量浓度为1.351 g/mL的金欣口服液,然后用无菌的滤器滤过除渣,备用。质量控制则以麻黄中的麻黄碱及虎杖中的白藜芦醇的定性鉴别为标准。

2 方法

2.1 RSV扩增及半数细胞感染量(TCID₅₀)测定

体外培养Hep-2细胞以扩增RSV,参照本实验室建立的方法^[9]。病毒滴度的测定采用Reed-Muench公式计算,本实验所用病毒TCID₅₀为10^{-4.038}/100 μL。

2.2 动物实验及样本收集

将32只BALB/c小鼠常规饲养于南京中医药大学实验动物中心,12 h光照、12 h黑暗环境下自由饮食。实验期间饲养室温度设定为18~22℃,相对湿度为50%~60%。将小鼠随机分为3组,分别为对照组(8只)、模型组(16只)和金欣口服液组(8只)。除对照组外,余皆在乙醚浅麻醉后50 μL/只鼻腔滴注100×TCID₅₀的RSV悬液(对照组给予同剂量的DMEM高糖培养基,每日滴鼻1次),待全部吸入鼻腔后放回饲养笼中并记录时间^[2]。滴鼻2 h后,金欣口服液组ig给予27.6 g/(kg·d)(相当于2岁儿童临床等效剂量),其余各组皆给予同剂量的生理盐水。连续滴鼻并给药3 d后,于第4天随机处死8只模型组小鼠,取脾脏,除去表面附着脂肪等组织,用生理盐水稍加清洗后吸干脏器表面水分,称质量,转移至2 mL冻存管中于-80℃保存。剩余小鼠继续给药至第6天,禁食24 h,第7天末次给药2 h后,处死后以上述方法取脾脏。同时取部分右肺下叶用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,采用常规的HE染色,置于光学显微镜观察。

2.3 GC-MS分析条件

2.3.1 色谱条件 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),程序升温:初始柱温设为60℃,保留1 min,以20℃/min升温至320℃后,再保

留 4 min。进样口温度为 250 °C，载气为高纯氦气，体积流量为 1.2 L/min，柱前压为 100 kPa，采用分流模式进样（分流比为 20:1），进样量为 1 μ L。

2.3.2 质谱条件 电离方式选用 EI，碰撞能量为 70 eV，离子源温度 280 °C，离子传输线温度 250 °C，溶剂延迟时间设为 3.5 min，扫描方式：60~600 m/z 全扫描。

2.4 样品预处理及衍生化

将小鼠脾脏置于冰上，每个样本准确称量 30 mg，置于相应编号的离心管内，加入 1 mL 甲醇，然后用球磨仪磨碎 15 min，吸取 600 μ L 脾脏匀浆，加入含 10 μ g 内标 1,2- 13 C 肉蔻酸的甲醇 20 μ L，涡旋 2 min，4 °C、10 000 r/min 离心 10 min，取 300 μ L 上清液，置于离心浓缩仪中挥干 2 h。加入 15 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液 50 μ L，混匀 5 min，室温下静置 16 h 后加入 50 μ L 的 BSTFA（含 1% TMCS），混匀后静置 1 h。3 000 r/min 离心 5 min 后，吸取上清液 60 μ L 于玻璃内插管中，供 GC-MS 进样分析。

2.5 数据分析与软件

根据 GC-MS 总离子流图（TIC）中各峰的保留时间以分离共有峰，获取相对峰面积比值（各峰面

积/内标峰面积）表示代谢物的量。使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析检查组间差异。共有峰的挑选、分离、峰对齐、计算相对峰面积使用 Thermo Fisher 公司的 Xcalibur2.0.7 数据处理系统，正交偏最小二乘法-判别分析（OPLS-DA）使用 SMCA-P12.0 软件（Umetrics 公司，瑞典）。

3 结果与分析

3.1 代谢组学方法的建立及脾内代谢物的鉴定

脾脏组织 GC-MS 分析 TIC 如图 1 所示。根据 TIC 中的共有峰，利用美国国家标准与技术研究院（NIST）质谱数据库以鉴定共有的内源性代谢物，通常认为匹配度高于 800 且可能性高于 80% 的鉴定结果可信度比较高^[10]。鉴定结果中某些离子峰的匹配度很高而可能性较低，主要与裂解规律相似及同分异构现象有关。此外，本实验还通过对照品比对以鉴定某些代谢物。共鉴定 35 种内源性代谢物，见表 1。混合对照组、模型组和金欣口服液组的脾脏组织匀浆液，制备质控（QC）样本，随批次进样，进样结果发现，各 QC 样本相对峰面积的相对标准差（RSD）在 1.38%~4.56%，提示所建立的代谢组学分析测定方法稳定性较好。

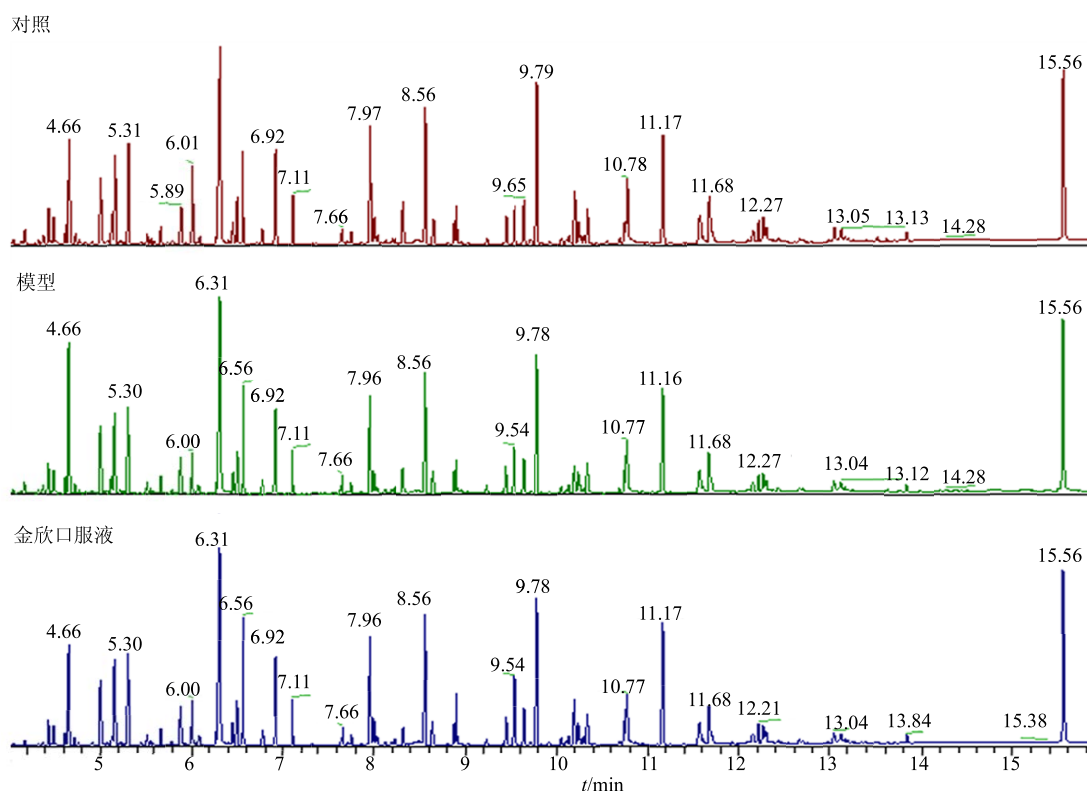


图 1 各组小鼠脾脏组织的 TIC 图

Fig. 1 TIC of spleen tissue of mice in each group

表 1 脾脏内源性代谢物
Table 1 Endogenous metabolites in spleen

t_R /min	匹配度	反向匹配度	可能性/%	NIST 谱库中最匹配的物质	内源性代谢物
4.66	936	960	38.37	丙酸、三甲基氧-、三甲基硅酯	丙酸*
5.01	915	927	79.32	<i>L</i> -丙氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、三甲基硅酯	丙氨酸
5.13	930	938	94.17	甘氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、	甘氨酸*
5.59	779	906	84.14	磷酸、二(三甲硅基)单甲基酯	磷酸
5.89	910	915	81.40	<i>L</i> -缬氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、三甲基硅酯	缬氨酸
6.01	909	909	93.86	尿素、 <i>N,N'</i> -二(三甲硅基)-	尿素
6.32	931	932	96.11	硅醇、三甲基-磷酸 (3:1)	磷酸
6.46	894	944	71.39	<i>L</i> -异亮氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、三甲基硅酯	异亮氨酸*
6.50	782	815	64.87	<i>L</i> -脯氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、三甲基硅酯	脯氨酸*
6.56	880	945	82.26	甘氨酸、 <i>N,N'</i> -二(三甲硅基)-、	甘氨酸*
6.78	809	825	80.12	嘧啶、2,4-二-三甲基硅氧基-	嘧啶
6.92	940	940	94.80	丝氨酸、 <i>N,O</i> -二(三甲硅基)-、	丝氨酸*
7.11	924	925	96.32	<i>N,O,O</i> -三(三甲硅基)- <i>L</i> -苏氨酸	苏氨酸*
7.66	894	909	96.64	氨基丙二酸、三(三基硅基)-	氨基丙二酸
7.76	853	874	85.68	苹果酸、[(三甲硅基)氧]-、	琥珀酸
7.97	906	933	93.71	<i>L</i> -天冬氨酸、 <i>N</i> -三甲硅基-、	天冬氨酸*
8.01	850	868	61.10	<i>L</i> -脯氨酸、5-氧-1-三甲硅基-、	脯氨酸*
8.03	898	906	91.74	丁酸、4-二(三甲硅基)氨基-、三甲基硅酯	丁酸*
8.20	854	937	74.50	胱氨酸、 <i>N,S</i> -二(三甲基)-、	胱氨酸
8.24	805	857	68.90	<i>L</i> -蔗糖酸、三-三甲基硅酯、三甲基硅酯	蔗糖酸
8.56	939	939	93.43	<i>L</i> -谷氨酸、 <i>N,N</i> -三甲硅基-、	谷氨酸*
8.65	918	921	68.28	<i>N,O</i> -二(三甲硅基)-苯丙氨酸	苯丙氨酸*
8.82	803	873	57.14	葡萄糖酸、2-甲氧基、四(三甲基硅)-、三甲基硅酯	葡萄糖酸
8.88	887	820	87.37	<i>L</i> -天冬酰胺、 <i>N,N</i> 2-二(三甲基硅)-、三甲基硅酯	天冬酰胺
8.91	927	927	96.97	2-二(三甲基硅)牛磺酸、三甲基硅酯	牛磺酸
9.45	895	905	95.66	<i>L</i> -谷氨酰胺、三(三甲基硅)衍生物	谷氨酰胺*
9.54	854	883	96.76	磷酸、2-[二(三甲基硅)氨基]乙基、二(三甲基硅) 酯	磷酸
9.65	929	932	95.33	次黄嘌呤、9-(三甲基硅)-6-[(三甲基硅)氧]-	次黄嘌呤
9.71	779	837	76.51	<i>DL</i> -鸟氨酸、 <i>N,N,N'</i> -三(三甲基硅)-、	鸟氨酸*
10.20	931	931	23.71	<i>D</i> -葡萄糖、2,3,4,5,6-五- <i>O</i> -三甲基硅-、 <i>O</i> -甲基氧-、(1 <i>Z</i>)-	葡萄糖*
10.24	778	860	79.87	<i>L</i> -赖氨酸、 <i>N</i> 2, <i>N</i> 6, <i>N</i> 6-三(三甲基硅)-、	赖氨酸*
10.26	808	914	96.38	<i>L</i> -组氨酸、 <i>N</i> 1-bis(三甲基硅)-、三甲基硅酯	组氨酸*
10.30	894	903	15.28	<i>D</i> -半乳糖、2,3,4,5,6-五- <i>O</i> -三甲基硅-、 <i>O</i> -甲基氧-、(1 <i>E</i>)-	半乳糖*
10.34	852	861	74.88	<i>L</i> -酪氨酸、 <i>N,O</i> -二(三甲基硅)-、	酪氨酸*
10.75	919	922	94.62	7-三甲基硅-2,6-二(三甲基)氧-7 <i>H</i> -嘌呤	7 <i>H</i> -嘌呤
11.17	926	926	84.78	肌醇、1,2,3,4,5,6- <i>O</i> -(三甲基硅)-	肌醇*
11.68	871	882	88.82	硬脂酸、三甲基硅酯	硬脂酸
12.21	880	892	42.81	<i>D</i> -葡萄糖、2,3,4,5-四- <i>O</i> -三甲基硅-、 <i>O</i> -三甲基氧	葡萄糖*
13.12	836	893	89.32	棕榈酸、2,3-二(三甲基氧)丙基酯	棕榈酸*
13.84	808	820	90.78	硬脂酸、2,3-二(三甲基氧)丙基酯	硬脂酸
15.56	910	911	81.00	胆固醇、三甲基硅酯	胆固醇*

*与对照品对照鉴定代谢物

*identified by reference

3.2 RSV 感染 BALB/c 小鼠的肺组织病理变化

如图 2 所示, 对照组小鼠肺脏肺泡上皮完整, 结构清晰, 肺泡壁毛细血管无扩张充血, 腔内无渗出物, 间质少量慢性炎细胞浸润, 肺间隔及支气管完好无损。模型组小鼠肺脏可见间质多灶性炎细胞浸润, 以单核细胞、淋巴细胞为主; 肺泡壁轻度充血, 肺泡壁明显增厚。金欣口服液组小鼠肺泡结构清晰, 肺泡上皮完整, 肺泡腔内无明显渗出物, 肺泡壁毛细血管无扩张及增厚, 间质少量炎细胞浸润。因此, 本研究成功建立 RSV 肺炎模型, 并证实金欣口服液具有治疗 RSV 感染的疗效。

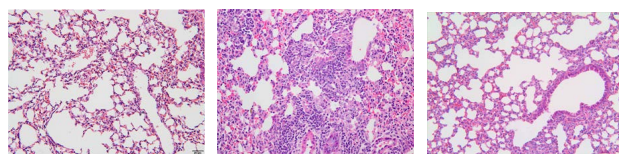


图 2 各组小鼠脾组织病理学检查

Fig. 2 Histopathological analysis of mice spleen in each group

3.3 代谢组学研究

代谢组学数据处理中, OPLS-DA 是最常用的方法之一。作为一种新型的多元统计分析方法, 它可以去除自变量 X 中与分类变量 Y 无关的数据变异, 使分类信息主要集中在一个主成分中。

3.3.1 RSV 肺炎小鼠感染 3、7 d 的代谢物谱分析 将对照组、RSV 感染 3 d 与 7 d 小鼠的脾脏中的代谢物的数据矩阵 (经内标准品归一化处理) 导入 SIMCA-P12.0 软件进行分析构建 OPLS-DA 模型。如图 3 示, 模型参数 $R^2_X=0.925$, $R^2_Y=0.793$, $Q^2=0.74$ 。RSV 感染 3 d 时, 即在感染初期小鼠体内的代谢物谱较对照组发生变化, 与对照组可显著分离; RSV 感染 7 d 时, 其代谢物谱进一步偏离对照组, 提示在感染后期其体内代谢物进一步发生改变。因此, 在 RSV 感染期间, 小鼠体内的代谢物可能呈动态变化趋势。

3.3.2 金欣口服液对 RSV 肺炎的干预 RSV 肺炎引起小鼠机体代谢紊乱, 金欣口服液作为治疗病毒性肺炎的有效方剂, 可使紊乱的代谢恢复至正常^[3]。将对照组、模型组和金欣口服液组小鼠脾脏中的内源性代谢物的数据矩阵用内标准品归一化处理后导入 SIMCA-P12.0 软件以构建 OPLS-DA 模型, 模型参数 $R^2_X=0.952$, $R^2_Y=0.959$, $Q^2=0.895$, 提示本模型的建模能力和预测能力均较好。由图 4 可以

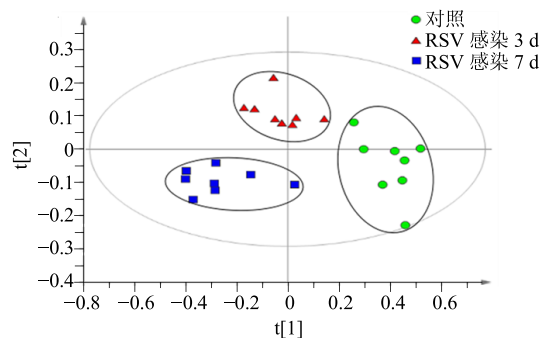


图 3 RSV 感染后脾脏内源性代谢物谱模式分析 OPLS-DA 图
Fig. 3 OPLS-DA score plots of endogenous metabolites in spleen of mice infected RSV

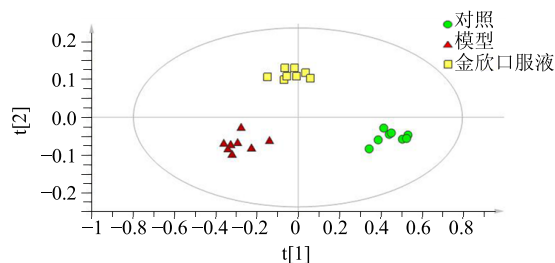


图 4 各组小鼠脾脏内源性代谢物谱模式分析 OPLS-DA 图
Fig. 4 OPLS-DA score plots of endogenous metabolites in spleen of mice in each group

看出, 予金欣口服液干预后, 在治疗 7 d 时, 小鼠脾脏内因 RSV 感染而紊乱的代谢物谱具有逐渐恢复至正常状态的趋势。

3.4 差异代谢物的表达

运用单因素方差分析检验对照组、模型组、金欣口服液组的内源性代谢物的量的差异, 设 P 值为 0.05, 共发现 6 种差异性代谢物, 分别为脯氨酸、谷氨酸、缬氨酸、尿素、次黄嘌呤、葡萄糖。差异代谢物相对量结果见图 5。

3.5 相关代谢通路分析

将上述脾脏组织匀浆中的差异代谢物导入代谢通路数据库平台 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetPA>) 进一步分析, 代谢通路的重要值 (pathway impact, PI) 设定为 0.1, 结果见图 6。由此可知, 在脾脏组织中, 与金欣口服液干预 RSV 肺炎最为相关的是 D -谷氨酰胺和谷氨酸代谢通路 ($PI=1$), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢通路 ($PI=0.33$), 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路 ($PI=0.26$), 精氨酸和脯氨酸代谢 ($PI=0.16$)。

4 讨论

病毒作为一类特异性抗原, 侵袭机体后引起机体内源性代谢物及代谢通路发生变化, 运用代谢

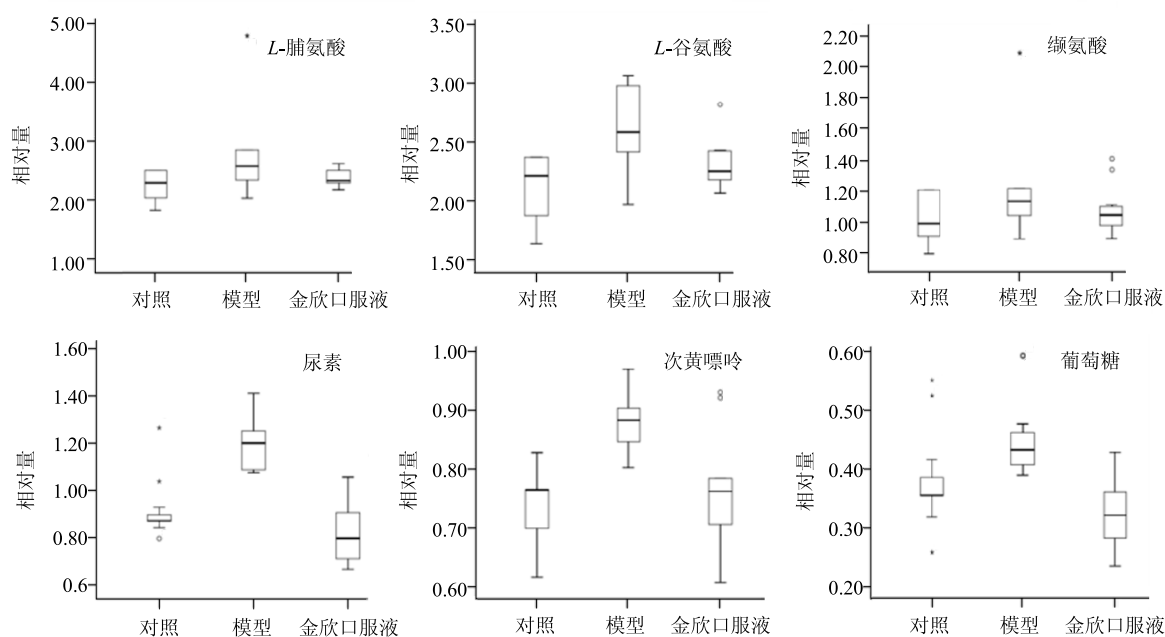
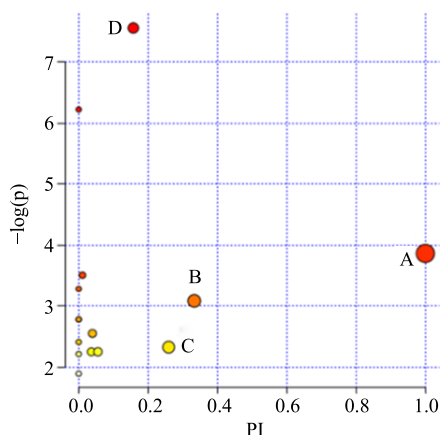


图 5 各组小鼠脾脏差异性代谢物相对量比较

Fig. 5 Comparison on relative concentration of different endogenous metabolites in spleen of mice in each group



A-*D*-谷氨酰胺和谷氨酸代谢通路 B-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢通路 C-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路 D-精氨酸和脯氨酸代谢
A-the metabolism pathway of *D*-glutamine and glutamic acid B-the metabolism pathway of valine, leucine, and isoleucine C-the metabolism pathway of alanine, aspartic acid, and glutamic acid D-the metabolism pathway of arginine and proline

图 6 相关代谢通路分析

Fig. 6 Analysis of metabolism pathway

组学技术及多维统计分析方法，可以分析其中变化规律，进而阐明其中机制。Semmo 等^[11]研究发现丙型肝炎病人血浆代谢物谱和正常人存在显著差别，其内葡萄糖、甘露糖、油酸酰胺和乳酸等代谢物的量发生显著变化；Munger 等^[12]报道人巨细胞病毒

感染细胞后，细胞内糖酵解、三羧酸循环、嘧啶合成的相关通路的代谢物呈动态变化。小鼠在患 RSV 肺炎时，体内的环境改变，代谢通路及相关代谢物也可能受到扰动。此猜想在本研究中得到证实，在小鼠 RSV 肺炎的病程中，其脾脏组织在 3 d 与 7 d 的代谢模式显著不同，提示 RSV 侵袭机体后，其内源性代谢物的量可能呈动态变化。

脾脏是机体重要的免疫器官，在发挥作用的过程中其内的代谢物也可能相应发生变化，运用代谢组学及多维统计分析方法分析其中变化有助于探究中药的作用机制。陈磊等^[13]运用 ¹H-NMR 代谢组学技术研究发现补中益气汤能明显降低脾虚证模型大鼠脾脏中的乳酸、牛磺酸、次黄嘌呤的量，升高谷氨酸、鲨肌醇的量 ($P < 0.01$)，使之趋向正常；Li 等^[14]运用 GC-MS 代谢组学技术研究发现当归可以调节脾脏内 *L*-缬氨酸、*L*-脯氨酸、花生四烯酸、*L*-苏氨酸、*L*-丙氨酸、甘氨酸、苹果酸等代谢物的代谢，从而发挥补血作用。本研究发现，RSV 肺炎时，脾脏内的次黄嘌呤、尿素、谷氨酸、脯氨酸的量均较对照组上调，显示其内源性物质的代谢可能发生紊乱。经金欣口服液治疗后，上述差异代谢物均较前有所回调，提示金欣口服液可能干预脾脏内源性代谢物的调节，从而调节脾脏发挥免疫作用。

脯氨酸是一种非必需氨基酸，主要由谷氨酸转

化生成。在机体脾脏内,脯氨酸参与促吞噬素的合成。促吞噬素是一种有生物活性的肽片段,能增强吞噬细胞的吞噬能力,促进吞噬细胞的趋化作用,启动吞噬细胞的免疫功能。本研究发现,RSV肺炎小鼠脾脏内的脯氨酸的量较对照组高,推测其促吞噬素的量亦较高,可能和RSV感染后机体的免疫紊乱相关。予金欣口服液治疗后,其脯氨酸的量下降,随之促吞噬素的量亦降低,提示金欣口服液治疗RSV肺炎可能与调节脾脏免疫功能有关。

谷氨酸也是一种非必需氨基酸,既可以转化为上述脯氨酸,尚具有其他生物活性。毕爱华等^[15]发现谷氨酸可能是潜在的免疫抑制剂,对细胞免疫和体液免疫均有明显的抑制作用。RSV肺炎时,机体的细胞免疫和体液免疫均增强。本研究发现,RSV感染后脾脏内的谷氨酸量较对照组增高,推测可能与机体增强的免疫反应相关,增多的谷氨酸可以反应性抑制体内增高的免疫反应。金欣口服液治疗后,谷氨酸的量较前下降,提示可能与调节机体免疫反应相关。尿素是氨基酸代谢的终产物。RSV肺炎小鼠脾脏内尿素的相对量增高,提示氨基酸的分解代谢增强,可能和RSV感染后机体的缺氧状态有关。RSV肺炎时,机体通气和换气功能障碍,能量供应不足,体内的氨基酸氧化分解以提供能量。

次黄嘌呤为嘌呤代谢物,在机体内可以通过腺嘌呤脱氨酶或亚硝酸作用由腺嘌呤脱氨生成。机体组织在缺氧状态下,ATP加速分解为二磷酸腺苷、一磷酸腺苷、次黄嘌呤,且此时次黄嘌呤转化为次黄嘌呤核苷酸的速率降低,导致机体内次黄嘌呤累积。Del Castillo Velasco-Martínez等^[16]研究发现海豚运动后红细胞内的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶活性增强,提示缺氧组织中次黄嘌呤的再利用可能增加。本研究发现,RSV肺炎小鼠脾脏内的次黄嘌呤量增高,提示可能是机体在缺氧状态下,ATP加速分解为次黄嘌呤,虽然再利用可能反应性增加,但总量仍高于正常小鼠。运用金欣口服液治疗后,次黄嘌呤的量较前下降,可能与缺氧状态改善有关。

本实验运用GC-MS的代谢组学分析方法^[17]研究RSV肺炎小鼠脾脏内源性代谢物的变化规律,发现脾脏内L-脯氨酸、L-谷氨酸、尿素、次黄嘌呤的量较对照组增高,经金欣口服液治疗后上述物质均有所回调,表明金欣口服液可以调节RSV感染

导致的免疫紊乱,其赖以发挥作用的物质基础可能与脾脏内氨基酸代谢有关。本研究进一步明确了金欣口服液治疗RSV肺炎的作用机制,也为临床应用提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 汪受传,朱先康,李江全,等.开肺化痰解毒法治疗小儿病毒性肺炎的研究[J].辽宁中医杂志,2001,28(7):410-412.
- [2] Chen Z G, Luo H, Wang S C, *et al.* Antiviral effects of Jinxin oral liquid against respiratory syncytial virus infection in the BALB/c mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 287-295.
- [3] Du L N, Xie T, Xu J Y, *et al.* A metabolomics approach to studying the effects of Jinxin oral liquid on RSV-infected mice using UPLC/LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 25-36.
- [4] 王克林,朱娟,翟志光,等.流感病毒对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响及板蓝根的干预作用[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(10):754-755.
- [5] 李旭芳,刘玲玲,张菊,等.急性MCMV感染对小鼠脾Th1/Th2/Th17细胞亚群分化的影响[J].中国免疫学杂志,2013,29(5):464-467.
- [6] 杜丽娜,单进军,徐建亚,等.金欣口服液不同化学部位对呼吸道合胞病毒感染的影响[J].南京中医药大学学报,2013,29(2):165-168.
- [7] 朱莹莹,袁斌,徐建亚,等.从TH1/TH2细胞平衡角度探讨清肺口服液对感染RSV小鼠内T-bet、GATA3水平的影响[J].辽宁中医杂志,2014,41(4):805-807.
- [8] 陈传喆,袁斌,徐建亚,等.清肺口服液早期抗呼吸道合胞病毒肺炎的作用机制[J].中医杂志,2014,55(16):1405-1408.
- [9] 李佳曦,汪受传,徐建亚,等.金欣口服液含药血清及其有效单体白藜芦醇对RSV的RNA聚合酶转录活性的影响[J].南京中医药大学学报,2011,27(1):36-39.
- [10] Major H J, Williams A J, Wilson A J, *et al.* A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(22): 3295-3302.
- [11] Semmo N, Weber T, Idle J R, *et al.* Metabolomics reveals that aldose reductase activity due to AKR1B10 is upregulated in hepatitis C virus infection [J]. *J Viral Hepatitis*, 2015, 22(7): 617-624.
- [12] Munger J, Bajad S U, Collier H A, *et al.* Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection [J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(12): 1165-1175.

- [13] 陈磊, 向欢, 邢婕, 等. 补中益气汤干预脾虚证模型大鼠脾脏 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学机制研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(9): 1320-1325.
- [14] Li P L, Sun H G, Hua Y L, *et al.* Metabolomics study of hematopoietic function of *Angelica sinensis* on blood deficiency mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166: 261-269.
- [15] 毕爱华, 王立人, 叶嗣颖, 等. 谷氨酸免疫抑制作用的研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 1985 (6):419-425.
- [16] Del Castillo Velasco-Martínez I, Hernández-Camacho C J, Méndez-Rodríguez L C, *et al.* Purine metabolism in response to hypoxic conditions associated with breath-hold diving and exercise in erythrocytes and plasma from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2015, 191: 196-201.
- [17] 田俊生, 左亚妹, 孙海峰, 等. GC-MS 代谢组学分析逍遥散干预抑郁模型大鼠盲肠代谢物组的变化规律 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1931-1936.