

基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学的还贝止咳方对咳嗽变异性哮喘豚鼠的干预作用

李媛^{1,2}, 张雯霞^{1,2}, 何盼², 王玉娥², 苗雨露², 刘聪², 康永², 倪艳^{2*}

1. 山西中医药大学, 山西 太原 030619

2. 山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

摘要: **目的** 采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学方法, 探讨还贝止咳方对鸡清白蛋白 (OVA) 致豚鼠咳嗽变异性哮喘 (CVA) 模型的作用机制。 **方法** 采用 ip 4% OVA 和 ip 2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ 制备豚鼠 CVA 模型, 观察还贝止咳方 (5、10、20 g/kg) 对 CVA 豚鼠辣椒素引咳后的影响。给药结束后, 取豚鼠右侧中叶肺组织进行 $^1\text{H-NMR}$ 检测, 采用多元统计分析方法探讨该方对 CVA 的干预作用。 **结果** 还贝止咳方能显著提高 CVA 豚鼠的咳嗽潜伏期, 降低其咳嗽次数 ($P < 0.01$), 并能明显减少肺灌洗液中的炎症因子 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组豚鼠肺组织的亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、 α -葡萄糖、乙酸、谷氨酸、甲硫氨酸、丙酮酸、琥珀酸、3-羟基丁酸酯、氧化谷胱甘肽、肌酸、乙醇胺、胆酸、甘氨酸、甘油磷酸胆碱、谷氨酰胺、甜菜碱、磷酸乙醇胺、 β -葡萄糖、精氨酸水平升高, 而乳酸、磷酸甲基酯的水平降低, 给予还贝止咳方后能不同程度回调这 24 个潜在的差异代谢物。 **结论** 还贝止咳方可能通过调控能量代谢、氨基酸代谢等途径来治疗 CVA。

关键词: 还贝止咳方; 咳嗽变异性哮喘; 代谢组学; 能量代谢; 氨基酸代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2230-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.002

Effects of Huanbei Zhike Recipe on cough variant asthma model guinea pig based on $^1\text{H-NMR}$ metabolomics

LI Yuan^{1,2}, ZHANG Wen-xia^{1,2}, HE Pan², WANG Yu-e², MIAO Yu-lu², LIU Cong², KANG Yong², NI Yan²

1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

2. Shanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of Huanbei Zhike Recipe on the cough variant asthma model (CVA) of guinea pigs by $^1\text{H-NMR}$ metabolomics methods. **Methods** The CVA model was induced by ip 4% OVA and ip 2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ in guinea pigs abdominal cavity, and the effects of Huanbei Zhike Recipe (5, 10, and 20 g/kg) on the cough induced by capsaicin was investigated. After the administration, the lung of right middle lobe in guinea pigs were taken out and determined by $^1\text{H-NMR}$, and multivariate statistical analysis was used to investigate the intervention effects of Huanbei Zhike Recipe on CVA. **Results** The cough latency of guinea pigs can be significantly prolonged and the frequency of cough were reduced ($P < 0.01$), and the inflammatory factors in lung lavage fluid were obviously reduced ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the levels of leucine, isoleucine, valine, alanine, α -glucose, acetic acid, glutamic acid, methionine, pyruvic acid, succinic acid, 3-hydroxybutyrate (3-HB), GSSG, creatine, ethanolamine, cholic acid, glycine, glycerophosphoryl choline (GPC), glutamine, betaine, phosphorylethanolamine (PE), β -glucose, and arginine were increased, while the levels of lactate and methyl-phosphate were decreased. These 24 potential metabolites could be reversely regulated in different degree after treatment with Huanbei Zhike Recipe. **Conclusion** Huanbei Zhike Recipe could prevent CVA diseases likely through the regulation of energy metabolism and amino acid metabolism.

Key words: Huanbei Zhike Recipe; cough variant asthma; metabolomics; energy metabolism; amino acid metabolism

咳嗽变异性哮喘 (cough variant asthma, CVA) 又称过敏性哮喘、隐匿型哮喘或咳嗽型哮喘, 是一种以慢性咳嗽为主要或唯一临床表现的特殊类型哮

喘, 是呼吸系统常见的疾病之一^[1-2]。儿童因支气管仍处在发育阶段, CVA 的发病率相对较高。目前, 针对小儿 CVA 患者, 西医治疗主要以支气管扩张

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201603D321028)

作者简介: 李媛 (1992—), 女, 山西太原人, 在读硕士, 研究方向为中药制剂新技术、新方法。Tel: 18234046955 E-mail: 18234046955@163.com

*通信作者 倪艳 (1965—), 女, 主任药师, 研究方向为中药化学及药效物质基础。Tel: (0351)4668016 E-mail: niyan_01@hotmail.com

剂、抗过敏性药物等进行治疗^[3]。激素类药物的使用会对儿童的消化道、生长发育等产生一定的不良反应,且依从性差。有研究显示^[4-5],CVA的发病机制及病理生理表现与典型哮喘相似,均为炎症细胞和炎性介质参与的慢性呼吸道炎症性疾病,并且以可逆性气流受限和呼吸道高反应性(BHR)为特征。然而,现阶段对其作用机制及其防治措施研究还远远不够,因此,开发新的具有治疗小儿CVA作用的药物已成为研究焦点。

还贝止咳方来源于山西省中医院的临床经验方,由还阳参、平贝母、苦杏仁、紫苏子、黄芩、地龙、僵蚕、乌梅、桃仁、枳壳、甘草11味药组成,具有清热肃肺、止咳平喘之功效,治疗顽固性咳嗽,临床上主要用于治疗CVA、喘息性支气管炎等肺热咳嗽,且疗效显著。方中还阳参止咳平喘作用显著,且无明显毒副作用^[6-7];清肺止咳、益气平喘的还阳参与润肺止咳、消痰下气的平贝母配伍,清润结合、止咳平喘,从而达到标本兼治的目的;黄芩治肺中湿热、泻肺火上逆,对于顽固性咳嗽,尤为有效^[8]。前期课题组已对该复方的止咳、祛痰、平喘及抗菌、抗过敏药效进行评价,结果显示其具有显著的止咳、祛痰、抗菌及抗过敏作用;还贝止咳方对鸡清白蛋白(OVA)诱导的CVA豚鼠模型有干预作用,但其作用机制目前尚不清楚。

代谢组学是利用核磁共振谱(NMR)或质谱(MS)技术采集数据,通过各种高通量的分析手段,对生物体液、组织提取物等进行系统分析,找出相关的差异代谢物,阐述相关的代谢路径,对机体整体的状况和功能做出评价,从而探讨其应用于疾病诊断的可行性^[9-10]。由于中药复方是个复杂的成分群,采用代谢组学技术进行研究,既能够从整体观角度考察中药复方的疗效,又能从生物标志物及代谢通路层面考察中药复方的作用机制,与传统研究手段相比较,代谢组学技术更适合中药复方的药效及作用机制研究^[11]。因此,本研究以OVA诱导的CVA豚鼠为模型,采用¹H-NMR代谢组学技术进行分析,通过给药后内源性代谢物的变化规律,发现该方治疗CVA的潜在标志物,为临床上治疗小儿CVA的药物研发奠定基础。

1 材料

1.1 动物

普通级Hartley种幼年豚鼠105只,雌雄各半,体质量180~200g,购自北京市昌扬西山养殖场,

实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0007,合格证号11402300012899。

1.2 药材、试剂与仪器

还贝止咳方由还阳参、平贝母、苦杏仁、黄芩、地龙、枳壳、紫苏子、僵蚕、桃仁、乌梅、甘草11味药组成,还阳参采于山西省大同市山阴县,经检验符合《山西省中药材中药饮片标准》第1册,其余药材均购于安徽省亳州市药材市场,经山西省中医药研究院倪艳教授鉴定均符合《中国药典》2015年版标准,即还阳参为菊科植物屠还阳参 *Crepis turczaniowii* C. A. Mey. 的全草;平贝母为百合科植物平贝母 *Fritillaria ussuriensis* Maxim. 的干燥鳞茎;苦杏仁为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子;黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根;地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体;枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实;紫苏子为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥成熟果实;僵蚕为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体;桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子;乌梅为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实;甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。由山西省中医药研究院中药方剂研究所制成干膏[出膏率(25.23±1.40)%,含绿原酸(0.32±0.08)mg/g、总黄酮(25.05±2.10)mg/g],4℃保存,用时配成还贝止咳方生药质量浓度0.5、1.0、2.0g/mL供豚鼠实验用。

醋酸地塞米松(浙江仙琚制药股份有限公司,批号161040);小儿肺热咳喘颗粒(海南葫芦娃制药有限公司,批号160236);OVA(北京索莱宝科技有限公司,批号709B051);氢氧化铝干粉(天津惠瑞化工科技有限公司);辣椒素(Sigma公司);磷酸二氢钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);磷酸氢二钠(分析纯,北京化工厂);甲醇(分析纯,天津市申泰化学试剂有限公司);重水(D₂O, Sigma-aldrich公司,美国);3-(三甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc.公司,美国)。

SE402F奥豪斯电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);IKA T25数显高速匀浆机(德国IKA公司);

SIGMA 1-14 高速离心机 (SIGMA Laborzentrifugen Inc., 德国); Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer (德国 Bruker 公司, 600 MHz 核磁仪, 600.13 MHz 质子频率)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

动物适应性喂养 7 d 后进行实验 (所有动物饲养在恒定室温 20~25 °C、45%~60%湿度环境中), 105 只豚鼠随机分为对照组 ($n=10$) 与造模组 ($n=95$)。CVA 模型的复制^[12-13]: 选幼年豚鼠 (体质量 180~200 g), 雌雄兼用, 适应性饲养 1 周后开始造模, 第 1 天 ip 4% OVA 溶液 (将 1 g OVA 干粉溶于 25 mL 生理盐水中先配成 4% OVA 溶液) 0.5 mL, 同时 ip 2% Al(OH)₃ 0.2 mL, 第 7 天后, 加强致敏 1 次; 14 d 后, 造模组用 1% OVA 溶液雾化后攻击, 隔天 1 次, 每次 120 s, 共 7 次。第 29 天造模完成后, 将造模动物随机分为阳性化学药醋酸地塞米松组, 阳性中药小儿肺热咳喘颗粒组, 还贝止咳方低、中、高剂量 (5、10、20 g/kg) 组, 每组 15 只。对照组和模型组豚鼠 ig 等体积生理盐水 (10 mL/kg), 阳性化学药组 ig 给予醋酸地塞米松混悬液 1.2 mg/kg, 阳性中药组 ig 给予小儿肺热咳喘颗粒 6.5 g/kg, 还贝止咳方低、中、高剂量组分别 ig 相应质量浓度的药物。各组均每天 ig 给药 1 次, 连续给药 7 d。末次给药后, 将豚鼠置于 5 L 的干燥器中, 用 1×10^{-4} mol/L 辣椒素溶液 (取辣椒素 30.5 mg, 依次加入聚山梨酯-80 溶液及无水乙醇各 1 mL 溶解, 再加入生理盐水 8.0 mL, 配成 10 mmol/L 的辣椒素原液, 取 1 mL 10 mmol/L 的辣椒素原液, 稀释至 100 mL, 配制成 0.1 mmol/L 辣椒素溶液) 雾化 2 min 后, 观察并记录豚鼠咳嗽潜伏期及 5 min 内的咳嗽次数。然后 ip 乌拉坦溶液麻醉, 结扎右侧中叶肺片, 于颈部正中切开暴露器官, 插入磨圆的 5 mL 注射器针头, 用 4 mL 生理盐水慢慢注入气管内, 反复抽吸几次, 将洗液抽出, 回收洗液约 2 mL, 置于 5 mL EP 管中。将洗液静置 1 h 后, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 即得支气管肺泡灌洗液 (BALF)。用于检测炎症因子。采用酶联免疫技术对 BALF 中炎症因子白细胞介素-5 (IL-5)、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞三烯 E₄ (LTE₄)、神经生长因子 (NGF) 进行检测。

2.2 肺脏核磁样品制备及测定条件

取右侧中叶肺脏组织, 称取 200 mg 于 5 mL EP

管中, 吸取甲醇-水 (1:1) 溶液 1 000 μ L 进行匀浆, 13 000 r/min, 离心 15 min, 吸取上清液于 EP 管中, 氮气吹干, 加入 750 μ L 磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, KH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.4) 溶解, 13 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液 600 μ L 转移至 5 mm 核磁管中。

Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 谱仪 (配有 Broker 5 mm BBO 探头, 质子频率 600.13 MHz, 采集温度 300.3 K) 采集数据, 肺脏样品采用 Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (noesygppr1d) 脉冲序列压制水峰, 扫描次数 (Number of scans) 64, 谱宽 (Spectral Width) 12 345.7 Hz, 图谱大小 (Spectral Size) 65 536 数据点, 脉冲宽度 (Pulse Width) 30° (14.0 μ s), 傅里叶变换 LB 0.3 Hz, 延迟时间为 5.0 s。以 TSP 为内标。

2.3 ¹H-NMR 图谱处理

采用 MestReNova (version 6.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 核磁图谱处理软件对所有 ¹H-NMR 以 TSP (δ 0.00) 为标准对图谱进行化学位移的校正, 之后进行相位、基线调整, 对 δ 0.30~9.20 区域的谱图进行 δ 0.01 等宽度分割, 水峰 δ 4.50~5.10 区域和甲醇峰 δ 3.30~3.40 区域切除, 其余区段积分, 将所产生的积分数据进行归一化处理, 以消除切取的肺脏组织质量的影响。将数据导入 Excel 中进行下一步多元统计分析。

2.4 统计分析

采用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, 瑞典) 软件对 ¹H-NMR 采集处理的积分数据中心化和规格化后, 进行多元统计分析, 主要包括主成分分析 (PCA), 结果以 PCA score plot 表示, 进一步用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 优化组间差异, 以相应的 VIP (variable importance in projection) 值来寻找差异成分, VIP 值越大, 表明该积分区间对应的化合物对分组贡献越大。采用 SPSS 22.0 软件中 One-Way ANOVA 对差异代谢物进行显著性检验。

3 结果

3.1 对 CVA 豚鼠模型的影响

3.1.1 对辣椒素引咳的影响 结果见表 1。与对照组比较, 模型组豚鼠的咳嗽潜伏期明显缩短 ($P<0.05$), 5 min 内的咳嗽次数显著增加 ($P<0.01$), 说明模型组豚鼠对辣椒素的刺激敏感。与模型组比较, 各给药组豚鼠的咳嗽潜伏期均明显延长 ($P<$

表 1 还贝止咳方对 CVA 豚鼠模型辣椒素引咳的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Huanbei Zhike Recipe on CVA model of guinea pig induced by capsaicin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	咳嗽 潜伏期/s	5 min 内 咳嗽次数
对照	—	52.875 ± 25.782	19.625 ± 6.278
模型	—	31.857 ± 7.381*	27.286 ± 4.680**
醋酸地塞米松	0.001 2	80.333 ± 19.159 ^{##}	10.667 ± 1.633 ^{##}
小儿肺热咳喘颗粒	6.5	57.500 ± 21.987 [#]	11.250 ± 4.400 ^{##}
还贝止咳方	5	80.857 ± 16.088 ^{##}	10.714 ± 2.752 ^{##}
	10	76.000 ± 15.766 ^{##}	12.875 ± 3.271 ^{##}
	20	89.167 ± 16.068 ^{##}	10.500 ± 3.209 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$, 下同

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

group, same as below

0.05、0.01), 5 min 内咳嗽次数显著减少 ($P < 0.01$)。

3.1.2 对 CVA 豚鼠模型 BALF 中炎症因子的影响
与对照组比较, 模型组 CVA 豚鼠 BALF 中的 IL-5、IL-10、NGF、TNF- α 水平明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01), LTE₄ 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组对 CVA 豚鼠 IL-5、IL-10、NGF、TNF- α 等炎症因子均有下调作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 对 LTE₄ 有上调的作用 ($P < 0.05$ 、0.01)。还贝止咳方低、中、高剂量组对 CVA 豚鼠 IL-5、IL-10、LTE₄、TNF- α 的回调作用与醋酸地塞米松的作用相当, 对 NGF 的下调作用优于小儿肺热咳喘颗粒, 但差异无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

3.2 肺脏图谱指认及分析

豚鼠肺脏组织的核磁图谱见图 1, 根据其化学位移、峰形、偶合常数, 结合文献报道^[14-15]及数据

表 2 还贝止咳方对 CVA 豚鼠模型 BALF 中炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Huanbei Zhike Recipe on inflammatory factors in BALF of CVA guinea pig model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-5/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	LTE ₄ /(pg·mL ⁻¹)	NGF/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	216.59 ± 30.86	45.67 ± 8.00	774.92 ± 249.99	285.22 ± 25.70	214.51 ± 58.12
模型	—	332.11 ± 45.21**	54.46 ± 9.84*	484.37 ± 160.39*	313.72 ± 25.58*	319.61 ± 48.63**
醋酸地塞米松	0.001 2	271.00 ± 100.42 [#]	46.01 ± 11.02 [#]	893.85 ± 172.48 ^{##}	274.97 ± 21.65 [#]	238.27 ± 61.47 [#]
小儿肺热咳喘颗粒	6.5	247.51 ± 33.22 ^{##}	32.59 ± 5.34 ^{##}	882.19 ± 156.69 ^{##}	302.98 ± 21.12	188.99 ± 66.82 ^{##}
还贝止咳方	5	258.03 ± 12.98 [#]	34.79 ± 6.85 ^{##}	822.49 ± 195.13 ^{##}	281.68 ± 19.55 [#]	228.54 ± 78.63 [#]
	10	252.06 ± 61.48 [#]	35.73 ± 6.59 ^{##}	911.57 ± 126.68 ^{##}	277.32 ± 34.29 [#]	221.36 ± 48.80 [#]
	20	253.26 ± 42.70 [#]	34.04 ± 10.60 ^{##}	730.62 ± 262.10 [#]	274.41 ± 31.36 [#]	251.67 ± 77.69 [#]

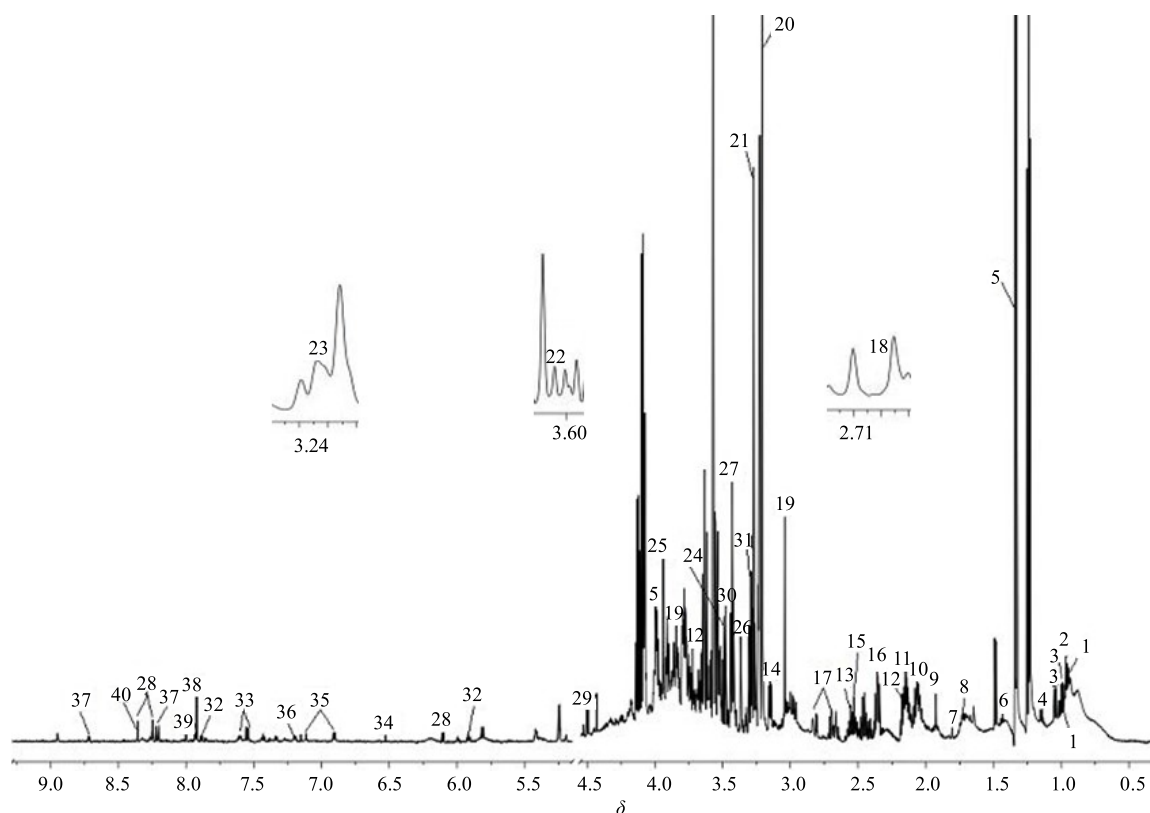
库 the human metabolome database (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>), biological magnetic resonance data bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu/>) 对图谱进行指认, 共鉴定 40 个化合物, 结果见表 3。

3.3 多元统计分析

豚鼠肺组织的 ¹H-NMR 图谱提供了大量的指纹信息, 但直观分析图谱, 较难发现各组间的差异, 因此, 采用多元统计分析方法对所有图谱进行全面比较及准确揭示各组间的差异。采用有监督的 PLS-DA 方法对对照组, 模型组, 还贝止咳方低、中、高剂量组的豚鼠肺组织 ¹H-NMR 图谱进行数据矩阵的代谢轮廓分析 (图 2)。结果显示, 对照组与模型组明显分开, 表明由 OVA 引起的 CVA 豚鼠模型肺组织中的内源性代谢物发生了变化; 还贝止咳方各剂量组均与模型组明显分开, 进一步说明了各给药组具有一定的回调作用, 与行为学及生化指标结果基本一致。

无监督判别模式 PCA 可以反映机体受外界干预的整体变化, 为了获得更详细的差异代谢物, 对对照组与模型组进行 PCA 分析, 可以看出二者分离较为明显, 存在较大差异, 结果如图 3-A 所示。为了进一步使得对照组与模型组之间的差异最大化, 采用了 PLS-DA 评分图与模型验证图, 结果如图 3-B、C 所示, 由图可知对照组与模型组分别位于 PCA 及 PLS-DA 得分图的左右两侧, PLS-DA 模型通过 200 个置换的置换检验得到验证, 左端任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 小于右端, 说明 PLS-DA 模型验证有效性, 对照组与模型组之间存在差异代谢。

OPLS-DA 可以消除组内误差及消除与研究目的无关的随机误差, 且能够体现数据的整体特征与变化规律, 有利于提高模型的有效性和解析能力^[16]。为进一步确定造模前后豚鼠肺脏组织中内源代谢产物的差异, 利用有监督模式的 OPLS-DA 来确定对照组与

图 1 豚鼠肺脏组织 ^1H -NMR 图谱Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of guinea pig lung tissue表 3 豚鼠肺脏组织主要代谢物的 ^1H -NMR 数据归属Table 3 ^1H -NMR assignments of major metabolites in lung tissues of guinea pigs

编号	代谢物	δ_{H}	编号	代谢物	δ_{H}
1	异亮氨酸	0.95 (t, $J=7.2$ Hz), 1.01 (d, $J=7.2$ Hz)	21	甘油磷酸胆碱	3.22 (s), 3.63 (m)
2	亮氨酸	0.97 (d, $J=7.1$ Hz)	22	磷脂酰胆碱	3.23 (s), 3.61 (t, $J=4.2$ Hz)
3	缬氨酸	0.99 (d, $J=6.9$ Hz), 1.05 (d, $J=6.9$ Hz)	23	磷酸乙醇胺	3.23 (t, $J=6.0$ Hz), 3.99 (m)
4	3-羟基丁酸酯	1.20 (d, $J=6.6$ Hz), 2.32 (dd, $J=6.0, 12.4$ Hz), 2.41 (dd, $J=7.0, 14.8$ Hz)	24	牛磺酸	3.27 (t, $J=6.6$ Hz), 3.43 (t, $J=6.6$ Hz)
5	乳酸	1.33 (d, $J=6.6$ Hz), 4.13 (q, $J=7.2$ Hz)	25	甜菜碱	3.27 (s), 3.90 (s)
6	丙氨酸	1.49 (d, $J=7.2$ Hz)	26	鲨肌醇	3.36 (s)
7	精氨酸	1.72 (m), 1.92 (m)	27	磷酸甲基酯	3.47 (d, $J=4.2$ Hz)
8	鸟氨酸	1.75 (m), 1.93 (m)	28	腺苷	6.10 (d, $J=7.2$ Hz), 8.25 (s), 8.36 (s)
9	乙酸	1.93 (s)	29	β -葡萄糖	4.65 (d, $J=4.2$ Hz)
10	谷氨酸	2.07 (m), 2.36 (m), 3.75 (m)	30	甘氨酸	3.57 (s)
11	蛋氨酸	2.14 (s), 2.14 (m), 2.66 (t, $J=7.2$ Hz), 3.84 (m)	31	α -葡萄糖	5.24 (d, $J=4.2$ Hz)
12	谷氨酰胺	2.15 (m), 3.77 (m)	32	胞嘧啶核苷	5.91 (d, $J=4.2$ Hz), 6.07 (d, $J=7.8$ Hz), 7.85 (d, $J=7.8$ Hz)
13	氧化谷胱甘肽	2.17 (m), 2.54 (m), 3.27 (m)	33	尿嘧啶	5.81 (d, $J=7.8$ Hz), 7.55 (d, $J=7.2$ Hz)
14	乙醇胺	3.15 (t, $J=5.4$ Hz), 3.84 (t, $J=5.4$ Hz)	34	延胡索酸	6.53 (s)
15	琥珀酸	2.40 (s)	35	酪氨酸	6.91 (m), 7.20 (m)
16	丙酮酸	2.37 (s)	36	苯丙氨酸	7.33 (d, $J=7.2$ Hz), 7.43 (m)
17	天冬氨酸	2.67 (dd, $J=8.4, 16.8$ Hz), 2.82 (dd, $J=4.0, 17.4$ Hz)	37	烟酰胺	7.60 (dd, $J=12.0, 7.2$ Hz), 8.27 (d, $J=12.0$ Hz), 8.72 (d, $J=6.6$ Hz), 8.95 (d, $J=2.4$ Hz)
18	二甲胺	2.71 (s)	38	黄嘌呤	7.92 (s)
19	肌酸	3.04 (s), 3.94 (s)	39	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)
20	胆碱	3.20 (s)	40	甲酸	8.46 (s)

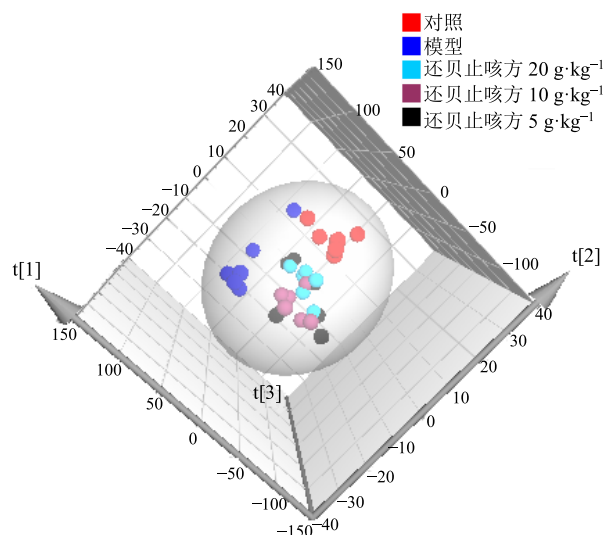


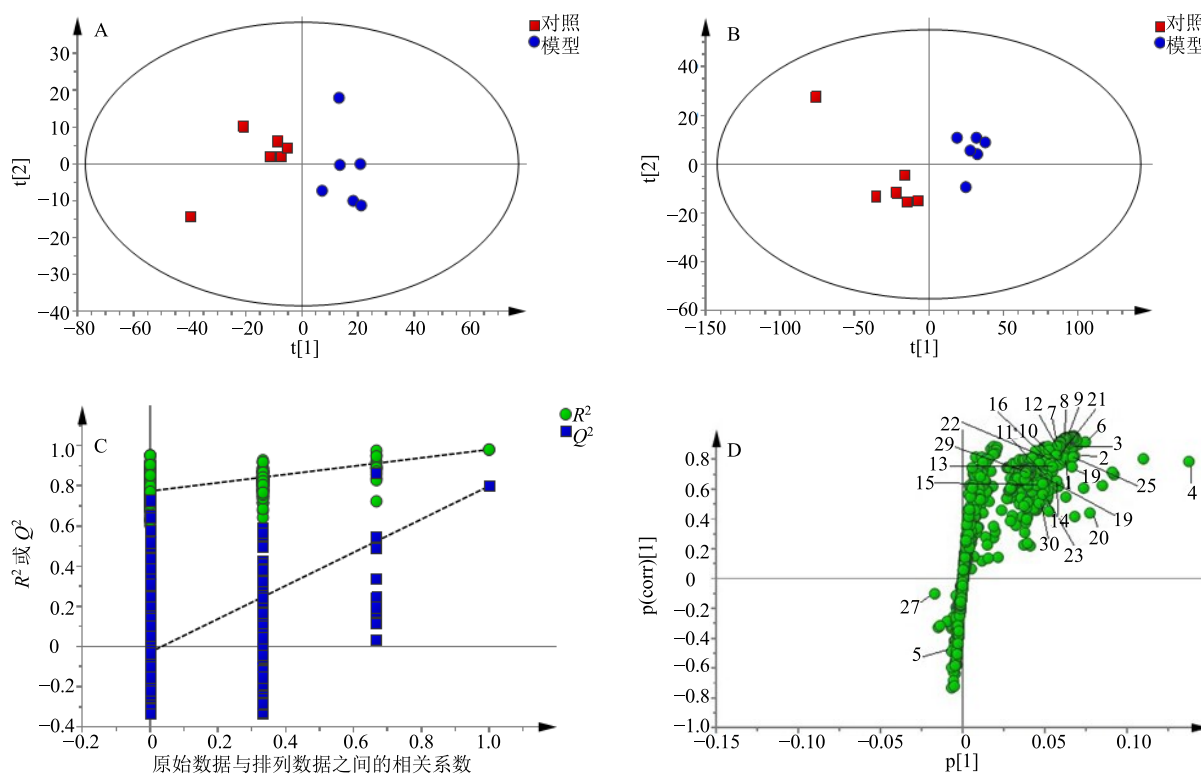
图 2 对照组、模型组及还贝止咳方各剂量组豚鼠肺脏组织 PLS-DA 3D 散点图

Fig. 2 PLS-DA 3D-score plots of lung tissues of guinea pigs in control group, model group, and each dose group of Huanbei Zhike Recipe

模型组代谢物的变化, 通过相应的 S-plot 图 (图 3-D) 与变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 值结合分析, 偏离中心越远的点说明对模型影响越大, 以 VIP 值大于 1 确定了 26 个差异代谢物。给予还贝止咳方干预后能显著回调 24 个, 包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、 α -葡萄糖、乙酸、谷氨酸、甲硫氨酸、丙酮酸、琥珀酸、3-羟基丁酸酯、氧化谷胱甘肽、肌酸、乙醇胺、胆酸、甘氨酸、甘油磷酸胆碱、谷氨酰胺、甜菜碱、磷酸乙醇胺、 β -葡萄糖、精氨酸、乳酸、磷酸甲基酯。

3.4 肺脏差异代谢物的相关分析

将上述确定的 26 个差异代谢物进行单变量分析, 核磁图谱的积分面积可以反映物质的相对含量, 因此将上述差异代谢物及内标 TSP 进行手动积分, 对其相对峰面积采用方差分析得出它们在各组中的含量变化趋势, 具体结果见图 4。与对照组比较, CVA 模型组亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、 α -葡萄糖、乙酸、谷氨酸、甲硫氨酸、丙酮酸、琥

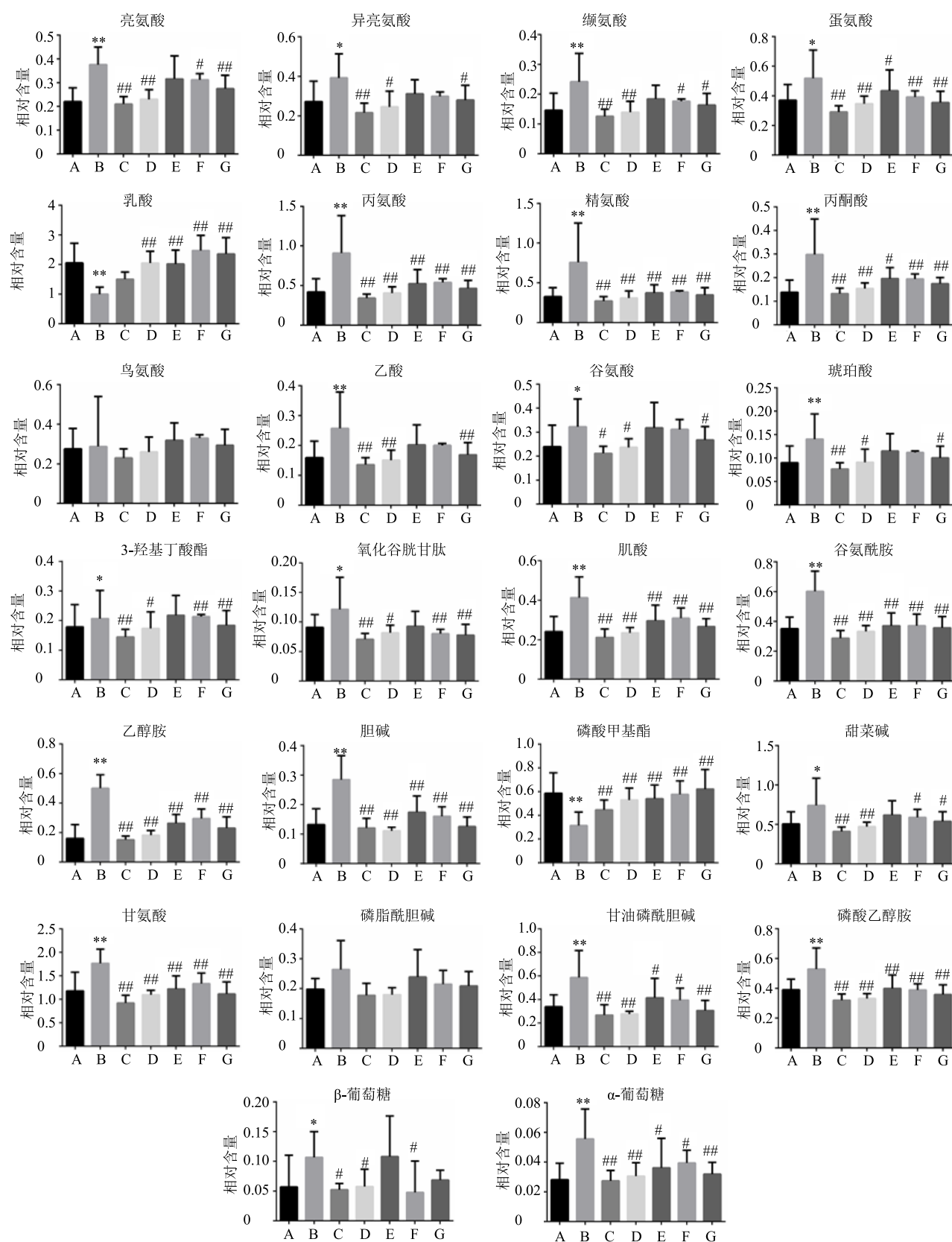


D 图中的代谢物编号与表 3 中代谢物编号相对应

Number of metabolites in Fig. D corresponding to number of metabolites in table 3

图 3 对照组与模型组豚鼠肺组织的 PCA 散点图 (A)、PLS-DA 散点图 (B)、模型验证图 (C) 和 S-plot 散点图 (D)

Fig. 3 PCA scores plot (A), PLS-DA scores plot (B), corresponding validation plot (C), and S-plot scores plot (D) derived from $^1\text{H-NMR}$ spectra of lung tissues of guinea pigs in control and model groups



A-对照组 B-模型组 C-地塞米松组 D-小儿肺热咳嗽颗粒组 E、F、G-还贝止咳方 5、10、20 g·kg⁻¹ 组

A-control group B-model group C-dexamethasone group D-Xiaoer Feire Kechuan group E, F, G-Huanbei Zhike Recipe 5, 10, and 20 g·kg⁻¹ group

图4 各组豚鼠肺组织差异代谢物相对含量

Fig. 4 Relative content of different metabolites in lung tissue of guinea pigs in each group

珀酸、3-羟基丁酸酯、氧化谷胱甘肽、肌酸、乙醇胺、胆酸、甘氨酸、甘油磷酰胆碱、谷氨酰胺、甜菜碱、磷酸乙醇胺、 β -葡萄糖、精氨酸含量升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01),而乳酸、磷酸甲基酯的含量下降,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,还贝止咳方组各剂量组的丙氨酸、 α -葡萄糖、乙酸、甲硫氨酸、丙酮酸、肌酸、乙醇胺、胆酸、甘氨酸、甘油磷酰胆碱、谷氨酰胺含量显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01);阳性对照药醋酸地塞米松及小儿肺热咳喘颗粒对上述差异代谢物均有回调的趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$),上述结果与多元统计分析结果基本一致。

3.5 代谢通路分析

差异代谢物是机体代谢途径中反映整体代谢信息的关键点,反映病理所对应的代谢网络发生异常后物质和功能的改变,并且能确定其所在的代谢通路的异常^[17],通过代谢组学研究,将 Pathway Impact >0.1 的代谢途径被列为最重要的代谢途径,得到与 CVA 模型相关的代谢通路如图 5 所示。

4 讨论

4.1 能量代谢

丙酮酸作为糖酵解的重要中间产物之一,在葡萄糖有氧氧化和能量产生中起关键作用,可通过乙酰辅酶 A (CoA) 和三羧酸循环 (TCA) 实现体内糖、脂肪和氨基酸间的互相转化,进而生成大量的苏氨酸、甘氨酸和丝氨酸^[18-19];并且乙酰 CoA 与磷酸作用,生成乙酰磷酸,再在乙酸激酶催化下产生乙酸。本研究中,模型组的丙酮酸水平升高表明 OVA 诱导的豚鼠有氧呼吸受到抑制。与模型组比较,还贝止咳方组大鼠肺组织丙酮酸、乙酸含量下降,提示有氧呼吸恢复。

Ho 等^[20]研究发现,哮喘动物中肺部细胞能量代谢的改变是一个显著的代谢特征,这可能与增加呼吸负荷,为炎症细胞提供能量有关;模型组肺组织中的 α -葡萄糖、 β -葡萄糖及乳酸的代谢异常,表明在 CVA 气道炎症中对能量的强烈需求,模型组肺组织中的乳酸可能重新转化成丙酮酸,进入 TCA 为机体供能。肌酸作为一种营养增补剂,辅助为肌肉和神经供能。有研究表明补充肌酸可以减轻慢性阻塞性肺病和囊性纤维化,但其能明显加重过敏性肺病炎症^[21]。也有研究显示哮喘小鼠模型的 BALF 中肌酸含量增加^[22],肌酸涉及的肌肉蛋白质周转和能量供应断层,如气道平滑肌^[23]。本实验中,CVA

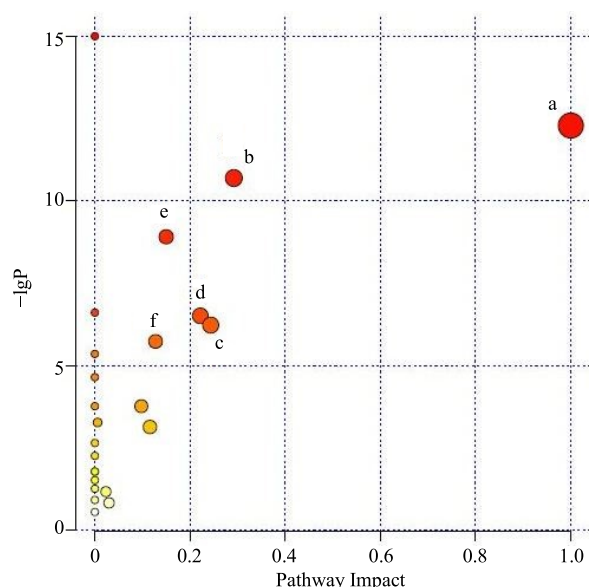
模型组肌酸含量较高,给药后含量降低,说明还贝止咳方各剂量组可以抑制过敏性哮喘肺部的炎症反应,从而发挥减轻肺组织炎症的作用。

4.2 氨基酸代谢

丝氨酸和苏氨酸是生酮氨基酸,与氨基酸的代谢障碍之间具有密切的关系^[24]。苏氨酸是免疫球蛋白中的一种必需氨基酸,炎症反应和感染性疾病均可改变生物体的蛋白质和氨基酸需要,在维持肠壁非特异性免疫屏障的完整中发挥重要功能^[25]。缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸为人体必需氨基酸,属于支链氨基酸 (BCAAs),三者作为生糖氨基酸,通过转氨基作用生成琥珀酰辅酶 A^[26],它在 TCA 中是很重要的一个酶,其在琥珀酸硫激酶的作用下生成琥珀酸。琥珀酸是先天免疫信号的代谢物,在炎症发生时可以通过转录因子 HIF-1 α 提高 IL-1 β 的产量^[27];有研究^[28]显示,轻度持续哮喘患者血清中琥珀酸具有最高的 VIP 或 AUC 值,对哮喘的诊断具有重要价值。本实验中模型组缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸含量较高,引起 α -葡萄糖、 β -葡萄糖和琥珀酸水平也相对较高。还贝止咳方低、中、高剂量组均能显著降低琥珀酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸含量。

谷氨酸通过谷氨酰胺合成酶生成谷氨酰胺,毕爱华等^[29]发现谷氨酸可能是潜在的免疫抑制剂,细胞免疫和体液免疫均有明显的抑制作用。谷氨酰胺已被报道可以抑制 NF- κ B 活化^[30],减少炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的释放,并且其肺组织病理切片得到改善。有研究显示,哮喘患者血清谷氨酰胺升高^[31]。本研究中还贝止咳方各剂量组的谷氨酰胺含量低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),仅有高剂量组的谷氨酸含量与模型组有统计学差异($P<0.05$),可能是谷氨酸与谷氨酰胺相互转化的结果;由于谷氨酰胺抑制了 NF- κ B 信号通路的活化,使得 BALF 中的 IL-5、IL-10、TNF- α 等炎症因子减少,各给药组的谷氨酰胺的含量均趋于对照组,可见谷氨酰胺对 CVA 引起的气道重塑也有一定的作用,与文献报道相一致^[32]。

精氨酸是动物细胞中功能最多的氨基酸之一,作为尿素、脯氨酸、谷氨酸、肌酸等的合成前体。精氨酸可以通过精氨酸酶和一氧化氮代谢途径作为免疫调节剂来调节免疫系统^[33]。脯氨酸是一种非必需氨基酸,可与谷氨酸和精氨酸相互转化生成。脯氨酸的代谢能够产生阴离子和活性氧 (ROS),并引发多种下游效应,ROS 可以上调一些细胞因子及



a-缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢 b-甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢 c-丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢 d-精氨酸、脯氨酸代谢 e-丙酮酸代谢 f-糖酵解或糖异生
a-valine, leucine, and isoleucine metabolism b-glycine, serine, and threonine metabolism c-alanine, aspartate and glutamate metabolism d-arginine and proline metabolism e-pyruvate metabolism f-glycolysis or gluconeogenesis

图5 CVA 的相关代谢通路

Fig. 5 CVA related metabolic pathways

黏附分子如 TNF- α 、IL-10 等的表达水平, 放大炎症效应^[34-35], 与 OVA 诱导大鼠哮喘模型^[14]的结果一致。本研究中还贝止咳方治疗组降低了精氨酸和脯氨酸的含量, 提示还贝止咳方治疗豚鼠 CVA 模型可能与免疫调节、ROS 产生机制有关。

综上所述, 以 ¹H-NMR 代谢组学技术结合代谢通路调控分析在豚鼠肺组织中筛选出 24 个 CVA 模型中潜在的生物标志物, 这些代谢物的变化参与了体内的能量代谢、氨基酸代谢等代谢通路, 其中丙酮酸、乙酸、肌酸、葡萄糖、乳酸等含量回调, 说明豚鼠肺组织有氧呼吸恢复, 能够为机体正常供能, 同时也抑制了肺组织的炎症反应; 苏氨酸、琥珀酸、谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、脯氨酸等含量趋于正常水平, 说明机体的免疫功能恢复; 可见, 还贝止咳方对 CVA 模型的代谢紊乱及免疫功能有一定的调节作用, 且上述 10 种氨基酸与 CVA 模型具有一定的相关性。现代药理研究显示, 方中还阳参和平贝母具有止咳、平喘、抗炎及抗菌等功效; 黄芩、枳壳、桃仁等均含黄酮类成分, 黄酮类成分具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏及免疫调节等作用, 提

示还贝止咳方能够作为治疗小儿咳嗽变异性哮喘的新药进行研发。此外, 单一的核磁分析难以检测到肺组织中的所有代谢物, 还需后续进一步采用液质联用技术对其作用机制进行深入研究。

参考文献

- [1] 马风桐. 咳嗽合剂治疗小儿咳嗽变异性哮喘的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [2] 罗社文, 李友林, 晁恩祥. 咳嗽变异性哮喘中医证型的初步探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(10): 708-710.
- [3] 张趁英, 徐丽华. 过敏性咳嗽与咳嗽变异性哮喘的临床区别 [J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(1): 53-54.
- [4] 王良红. 小儿咳嗽变异性哮喘的发病特点及护理体会 [J]. 当代医学, 2012, 18(9): 6-7.
- [5] 郑艳萍, 刘映玲, 黄慧芳, 等. 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道重塑影响的实验研究 [J]. 新中医, 2016, 48(7): 282-286.
- [6] 彭照琪, 岳永花, 李小贝, 等. 还阳参醇提物止咳祛痰平喘及抗炎作用的实验研究 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 423-426.
- [7] 倪艳, 刘振权, 康永, 等. 还阳参止咳平喘活性部位的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 519-520.
- [8] 郑洪新. 张元素医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.
- [9] 杜祥博, 周宁, 孙博, 等. 代谢组学在呼吸系统疾病研究中的应用进展 [J]. 生物技术通讯, 2015, 26(4): 574.
- [10] 陈佳佳, 李爱平, 张晓琴, 等. 基于核磁共振代谢组学的成分数据分析在中药评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3522-3526.
- [11] 赵凡凡, 李肖, 高丽, 等. 甘草水提取物干预 D-半乳糖衰老大鼠的肝脏代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3545-3553.
- [12] 高明, 张忠德, 李际强, 等. 豚鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立 [J]. 广东医学, 2016, 37(9): 1290-1292.
- [13] 蔡黎, 毕小利, 王忆勤, 等. 咳嗽变异性哮喘豚鼠模型的构建 [J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(12): 1070-1073.
- [14] Li J, Gao W, Gao J, et al. Metabolomics reveal the protective effect of *Farfarae Flos* against asthma using an OVA-induced rat model [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(63): 39929-39939.
- [15] 岳永花, 何盼, 孙迎娜, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学技术的青翘抗炎活性部位筛选及作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3443-3450.
- [16] 李艺, 范玛莉, 邢婕, 等. 龟龄集中细辛特殊炮制工艺的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2385-2393.

- [17] 林燕. 基于代谢组学的肺卫气虚证候变化规律及中药复方干预的临床研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [18] 耿放, 张宁, 方衡, 等. 逍遥散对急性肝损伤大鼠模型保护作用的代谢组学研究 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 275-279.
- [19] Plecko B, Stoeckler-Ipsiroglu S, Schober E, *et al.* Oral b-hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: Monitoring of β -hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by *in vivo* magnetic resonance spectroscopy [J]. *Pediatric Res*, 2002, 52(2): 301-306.
- [20] Ho W E, Xu Y J, Xu F G, *et al.* Metabolomics reveals altered metabolic pathways in experimental asthma [J]. *Amer J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(2): 204-211.
- [21] Fuld J P, Kilduff L P, Neder J A, *et al.* Creatine supplementation during pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Thorax*, 2005, 60(7): 531-538.
- [22] Vieira R P, Duarte A C S, Claudino R C, *et al.* Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice [J]. *Amer J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(6): 660-667.
- [23] Bolton C F. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Neuromuscular manifestations [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(8): 1408-1416.
- [24] 苟小军, 梁薇, 刘志丹, 等. 过敏性鼻炎患者血液代谢组学研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(18): 1777-1781.
- [25] 井明艳, 刘波静, 孙建义, 等. 氨基酸代谢与免疫反应 [J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(5): 37-39.
- [26] 林建华. 支链氨基酸: 代谢及其临床应用 [J]. 国际外科学杂志, 1991(2): 15.
- [27] Tannahill G M, Curtis A M, Adamik J, *et al.* Succinate is an in-inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α [J]. *Nature*, 2013, 496(7444): 238-242.
- [28] Chang C, Guo Z G, He B, *et al.* Metabolic alterations in the sera of Chinese patients with mild persistent asthma: A GC-MS-based metabolomics analysis [J]. 中国药理学报, 2015, 36(11): 1356-1366.
- [29] 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.
- [30] Singleton K D, Beckey V E, Wischmeyer P E. Glutamine prevents activation of NF-kappa B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis [J]. *Shock*, 2005, 24(6): 583-589.
- [31] Jung J, Kim S H, Lee H S, *et al.* Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis [J]. *Clin Exp All J Brit Soc All Clin Immunol*, 2013, 43(4): 425-433.
- [32] 施国善. 基于 NF- κ B 信号通路的抗支糖浆抑制咳嗽变异性哮喘气道重塑的作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [33] Wu G, Jr M S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond [J]. *Biochem J*, 1998, 336(1): 1-17.
- [34] Phang J M, Wei L, Zabirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress [J]. *Ann Rev Nutr*, 2010, 30(30): 441-463.
- [35] 张启云, 李冰涛, 李文宏, 等. 麻杏石甘汤对哮喘豚鼠的血浆代谢组学研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 12-15.