

## 蒲地蓝消炎口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的 GC-MS 代谢组学研究

钱文娟<sup>1,2</sup>, 杨 瑞<sup>1,3</sup>, 谢 彤<sup>1</sup>, 姚卫峰<sup>2</sup>, 康 安<sup>2</sup>, 狄留庆<sup>1,2\*</sup>, 单进军<sup>1\*</sup>

1. 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学医学与生命科学学院, 江苏 南京 210023

**摘要:**目的 筛选甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织中疾病相关差异性代谢物, 观察蒲地蓝消炎口服液对肺炎小鼠代谢物的调控作用, 探讨其治疗病毒性肺炎的作用机制。方法 将 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、蒲地蓝组和利巴韦林组( $n=10$ ), 以 H1N1 病毒尿囊液滴鼻造模。蒲地蓝组和利巴韦林组小鼠每日 ig 给药 1 次, 连续用药 6 d, 末次给药后 2 h 处死并收集肺组织样本。采用基于 GC-MS 的代谢组学技术分析各组小鼠肺组织样本中代谢物的变化, 综合  $P < 0.05$ 、VIP  $> 1.0$ 、Fold Change  $> 1.5$  条件筛选 H1N1 流感病毒性肺炎的疾病生物标志物。通过代谢通路富集分析初步探讨蒲地蓝消炎口服液治疗病毒性肺炎的作用机制。结果 H1N1 病毒感染导致小鼠肺部炎性细胞浸润及不同程度的肺炎, 多种代谢物代谢紊乱, 蒲地蓝消炎口服液及利巴韦林均能改善肺炎症状, 并对多种代谢物起到回调作用。结论 蒲地蓝消炎口服液主要通过调节机体内 14 个代谢物及 12 条相关代谢通路发挥治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的作用。

**关键词:** 蒲地蓝消炎口服液; 甲型 H1N1 流感病毒性肺炎; 代谢组学; GC-MS; 生物标志物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2258-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.005

## Metabolomics on Pudilan Xiaoyan Oral Liquid in treatment of Influenza A/H1N1-induced pneumonia based on GC-MS

QIAN Wen-juan<sup>1,2</sup>, YANG Rui<sup>1,3</sup>, XIE Tong<sup>1</sup>, YAO Wei-feng<sup>2</sup>, KANG An<sup>2</sup>, DI Liu-qing<sup>1,2</sup>, SHAN Jin-jun<sup>1</sup>

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

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To screen the pneumonia-related abnormal metabolites in lung tissue of mice infected by Influenza A/H1N1, and to monitor the regulation effect of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid and to explore potential anti-pneumonia mechanism. **Methods** ICR mice were randomly divided into four groups with ten mice in each group: normal group, model group, Pudilan group, and Ribavirin group. The mice were infected with H1N1 virus intranasally and gavaged once every-day for six consecutive days. 2 h after the last dose, the mice were sacrificed and lungs were collected. Metabolomics based on GC-MS was applied to analyze the changes of metabolites in the lung tissue of each group. The potential biomarkers of H1N1-induced pneumonia were screened by three conditions:  $P < 0.05$ , VIP  $> 1.0$ , and Fold Change  $> 1.5$ . Metabolic pathways related to the treatment mechanism of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid were analyzed. **Results** The infection of H1N1 virus leads to infiltration of inflammatory cells in the lungs of mice and various degrees of pneumonitis and metabolic disorders. Pudilan Xiaoyan Oral Liquid and ribavirin can both ameliorate the symptoms of pneumonia and play role in callback of various metabolites. **Conclusion** The treatment effect of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid on H1N1-induced pneumonia is related to the regulation effects on 14 potential biomarkers and 12 associated metabolic pathways.

**Key words:** Pudilan Xiaoyan Oral Liquid; influenza A/H1N1-induced pneumonia; metabolomics; GC-MS; biomarkers

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 江苏省“333 工程”科研项目(BRA2016427); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养资助项目(YY-022); 江苏省高校中医学优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 钱文娟(1994—), 女, 在读硕士。E-mail: 20161325@njucm.edu.cn

\*通信作者 单进军(1979—), 男, 副研究员。Tel: (025)85811329 E-mail: dfsjj@163.com

狄留庆(1964—), 男, 博士生导师, 教授。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing928@163.com

甲型 H1N1 流感病毒 (Influenza A/H1N1), 最初被称作“猪流感”, 属于急性病毒性呼吸道传染病, 每年造成世界范围内的高致病率及死亡率<sup>[1-2]</sup>。现有的抗 H1N1 病毒的药物主要有奥司他韦、利巴韦林等, 但是存在高耐药风险及经济负担, 而中医药可在抵抗流感病毒方面发挥积极作用<sup>[3-4]</sup>。蒲地蓝消炎口服液由蒲公英、板蓝根、苦地丁、黄芩组成, 临床上用于治疗急性上呼吸道感染, 疗效理想<sup>[5]</sup>。在使用蒲地蓝消炎口服液治疗儿童甲型 H1N1 流行性感冒中治愈效果良好<sup>[6]</sup>。体外细胞实验研究表明, 蒲地蓝消炎口服液具有抗呼吸道合胞病毒和腺病毒的作用<sup>[7]</sup>。

代谢组学是应用现代色谱质谱方法对基因、转录体、蛋白的下游产物——代谢物进行系统生物学研究的一门新兴组学技术<sup>[8]</sup>。代谢组学技术可以通过动态监测机体代谢物的变化<sup>[9]</sup>对疾病发病机制<sup>[10]</sup>及中药治疗作用机制<sup>[11]</sup>进行研究。

气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 是一种结合气相色谱高分离性及质谱高分辨能力同时具有快速、稳定、灵敏等特性的现代分析技术。结合多种样品衍生化技术及 GC-MS 的数据库, 可对生物样本进行定性定量分析, 常用于不同样本的代谢组学研究<sup>[12-13]</sup>。本实验中采用 GC-MS 技术检测 ICR 小鼠肺组织代谢物, 并通过比较不同组别不同代谢物的相对含量, 筛选 H1N1 流感病毒性肺炎疾病生物标志物, 从代谢通路角度初步探讨蒲地蓝消炎口服液治疗病毒性肺炎的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

ICR 小鼠 40 只, 体质量 13~16 g, 雌雄各半, 由扬州大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (苏) 2012-0004。适应性饲养 3 d 后, 开始进行动物实验。

### 1.2 病毒

甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1), 由中国预防医学科学院病毒所提供。

### 1.3 药品与试剂

蒲地蓝消炎口服液 (批号 1510313, 济川药业集团有限公司); 利巴韦林颗粒 (批号 160305, 四川百利药业有限责任公司); 乙醚 (上海马陆化工厂); 甲醇 (德国 Merck 公司); 1,2-<sup>13</sup>C-肉豆蔻酸、吡啶、*N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (BSTFA)、甲氧基胺盐酸盐 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 正己烷 (美国 ROE Scientific 公司); 氯化钠 (江苏太仓化工厂); 娃哈哈纯净水。

## 1.4 主要仪器

Trace1310/TSQ8000 气相色谱-质谱联用仪、TG-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 美国 Thermo Fisher 公司; CPA225D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); Allegra 64R 型离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司); Revco UXF 型超低温冰箱、SPD1010-230 型离心浓缩仪 (美国 Thermo Fisher 公司); KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); BSC-1500 II A2-X 生物安全柜 (济南鑫贝亚生物技术有限公司); YXQ-2S-50S II 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验及样本收集

**2.1.1 动物分组、模型制备与给药** 将 ICR 小鼠随机分为 4 组 ( $n=10$ ), 即对照组、模型组、利巴韦林组和蒲地蓝消炎口服液 (简称蒲地蓝) 组。除对照组外, 其余各组小鼠在乙醚浅麻醉后, 以 H1N1 流感病毒尿囊液 ( $LD_{50}=10^{1.22}$ ) 给小鼠滴鼻感染, 每鼠 50 μL, 对照组采用同法滴入等体积无菌生理盐水。各组小鼠于造模当天开始每日 ig 给药 1 次, 给药体积为 10 mL/kg, 对照组和模型组 ig 给予等量生理盐水, 蒲地蓝组及利巴韦林组给予临床等效剂量, 即蒲地蓝组给予 0.78 mL/kg 的蒲地蓝消炎口服液, 利巴韦林组给予 0.15 g/kg 的利巴韦林 [取 1 袋利巴韦林颗粒 (150 mg/袋) 研成细粉, 加入 20 mL 纯净水混溶, 即得给药溶液]。各组连续给药 6 d。

**2.1.2 样本收集** 各组小鼠于末次给药 2 h 后摘眼球取血、脱颈处死, 解剖并取左肺中叶用 10% 甲醛溶液固定, HE 染色。剩余肺组织置于 -80 °C 保存。

### 2.2 样本前处理及衍生化反应

取已经用甲醛固定的肺组织, 乙醇梯度脱水, 2 次二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 在 100× 显微镜下进行病理学观察, 拍照。

将冰冻于 -80 °C 的小鼠肺组织样本解冻后, 每个样本准确称取 50.0 mg [ $(50 \pm 2)$  mg], 置于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 甲醇, 球磨匀浆 10 min。吸取 600 μL 组织匀浆液于新的 1.5 mL 离心管中, 加入含有 300 μg/mL 1,2-<sup>13</sup>C-肉豆蔻酸的甲醇 20 μL, 涡旋。于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后取 300 μL 上清, 挥干 2 h, 再加入 10 mg/mL 甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液 50 μL, 混匀 5 min 后于 450 r/min 振荡 1.5 h。加入 BSTFA 50 μL, 混匀 5 min, 450 r/min 振荡 0.5 h,

最后 18 000 r/min 离心 10 min, 取上清进样。

### 2.3 GC-MS 分析条件

TG-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 以氦气为载气, 体积流量 1.2 mL/min, 进样口温度 250 °C, 进样量 1 μL, 分流比 20:1, 采用程序升温: 初始温度 60 °C, 保持 1 min; 以 20 °C/min 升至 320 °C, 保持 5 min。离子源温度为 280 °C, 离子传输温度为 250 °C, 电离能量 70 eV, 质谱扫描范围为  $m/z$  50~500, 采集时间为 3.5~19.0 min。

### 2.4 数据处理及统计分析

将 GC-MS 采集的图谱信息, 使用软件 MS-DIAL<sup>[14]</sup>和 NIST 数据库进行峰提取及物质鉴定, 得到的代谢物名称、组别、峰高组成的三维数据集。根据  $P<0.05$ 、VIP>1.0、Fold Change>1.5 这 3 项条件<sup>[15-16]</sup>筛选 H1N1 流感病毒性肺炎的疾病生物标志物。即将三维矩阵数据集导入 SIMCA13.0 进行偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 并以 VIP>1.0 为条件筛选差异性代谢物。将对照组与模型组的数据进行 Fold Change 检验, 以 Fold Change>1.5 寻找两组间的差异性物质。最后对数据进行总离子流归一

化、log 转化及 Pareto 校准后, 数据基本符合正态性分布, 从而进行单因素方差分析, 根据  $P<0.05$  筛选出对照组与模型组之间具有统计学意义的差异性代谢物。选取 VIP>1.0、Fold Change>1.5 和  $P<0.05$  筛选所得代谢物的交集作为疾病生物标志物。采用网站 Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 对数据进行聚类分析及代谢通路分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 各组小鼠肺组织病理学观察

对照、模型、蒲地蓝和利巴韦林各组小鼠肺组织 HE 染色结果见图 1。结果显示对照组小鼠肺组织呈正常形态, 支气管腔内无渗出物, 黏膜上皮无变性坏死脱落, 管壁及周围组织无炎细胞浸润, 肺泡间隔增厚。模型组小鼠肺组织支气管上皮细胞变性、坏死, 腔内见坏死细胞及大量渗出物, 病变支气管及其周围肺组织结构不清晰, 嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润, 肺泡壁增厚。蒲地蓝组总体病变程度较模型组低, 支气管周围可见炎细胞浸润。利巴韦林组肺肺炎、间质性肺炎大部分消退, 可见部分炎细胞浸润。

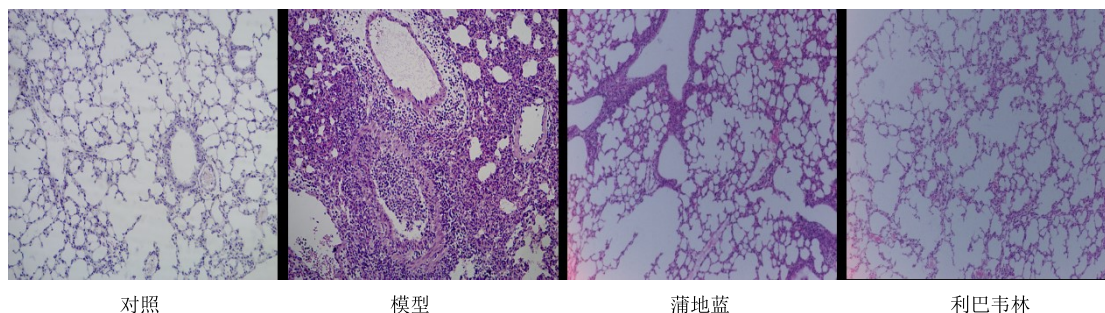


图 1 各组小鼠肺组织病理改变 (HE, ×100)

Fig. 1 Pathological change of lung tissue of mice in each group (HE, ×100)

### 3.2 代谢组学分析

**3.2.1 GC-MS 分析结果** 对照、模型、蒲地蓝和利巴韦林各组小鼠肺组织样本的典型 GC-MS 分析总离子流 (TIC) 图见图 2, 以谱图中最高色谱峰的离子强度为 100%。使用 MS-DIAL 及 NIST 数据库对色谱峰进行化合物鉴定, 并得到峰高、保留时间、化合物名称等信息, 共鉴定得到 151 种化合物, 包含氨基酸类如亮氨酸、甲硫氨酸等, 糖类如乳糖、果糖等, 脂肪酸类如花生四烯酸、棕榈酸等及嘌呤和嘧啶等小分子化合物。所鉴定的化合物广泛分布在核苷酸和氨基酸代谢通路、能量代谢通路、碳水化合物和脂质代谢通路方面。

**3.2.2 代谢轮廓分析及差异性代谢物的鉴定** 将

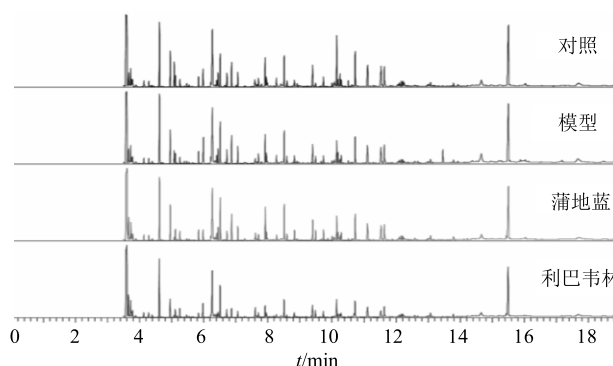


图 2 各组小鼠肺组织样本 TIC 图

Fig. 2 TIC of lung of mice in each group

MS-DIAL 处理后得到的代谢物名称、样品编号及峰高信息, 导入 SIMCA 13.0 进行主成分分析 (PCA)

及偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 结果见图 3。图中每个点代表一个样本, 所有样本点均分布在圆形区域内 (即 95% 置信区间), 其中, PLS-DA 得分图的  $R^2_Y=0.928$ ,  $Q^2=0.865$ , 表明数学模型的区分度及预测率较好。由图 3 可见, 对照组和模型组之间能明显区分, 提示对照组小鼠与感染 H1N1 病毒所致肺炎小鼠肺组织内代谢物存在明显的差异; 蒲地蓝组和利巴韦林组与模型组明显分离并向对照组靠近, 提示用药可一定程度上调节小鼠体内代谢物至正常水平, 从而发挥抗炎、抗病毒作用。使用图 3-B 所构建的 PLS-DA 模型计算肺组织样本中各变量的 VIP 值, 并以  $VIP>1.0$  初步筛选差异性代谢物。最后根据  $VIP>1.0$ 、Fold Change $>1.5$  和单因素方差分析  $P<0.05$ , 找出对照组与模型组之间有显著性差异的代谢物共 14 个, 即为 H1N1 流感病毒性肺炎的疾病生物标志物, 见表 1。对差异性代谢物归一化

后的数据进行聚类分析, 所得热图结果见图 4。热图中的每个方格代表某一代谢物在各组样本相应强度的平均值。图中红色代表强度上升, 蓝色代表强度下降。由图 4 可见, 对照组、蒲地蓝组和利巴韦林组相似性大, 并与模型组显著区分, 分成两束。模型组与对照组相比, 有 8 个代谢物上调, 即  $\beta$ -羟基丁酸、戊二酸、*L*-犬尿氨酸、蔗糖、胸腺嘧啶、腐胺、尿苷、嘧啶酸; 有 6 个代谢物下调, 即胞苷、葡萄糖酸、甘露醇、甲硫氨酸、黄嘌呤、黄嘌呤核苷。蒲地蓝组和利巴韦林组又与对照组略有区别, 分为两束。结果提示蒲地蓝消炎口服液和利巴韦林可通过调控部分代谢物达到治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的作用。

**3.2.3 代谢通路分析** 对对照组、模型组、蒲地蓝组和利巴韦林组小鼠的 14 种差异性代谢物归一化后的数据进行单因素分析, 各组小鼠肺组织中代谢物相对含量及变化趋势见图 5。在给予蒲地蓝消炎

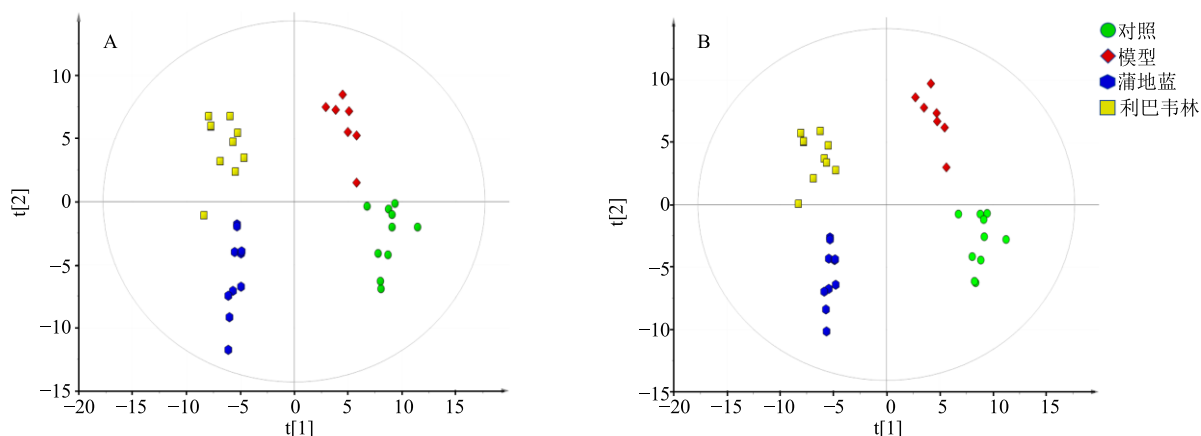


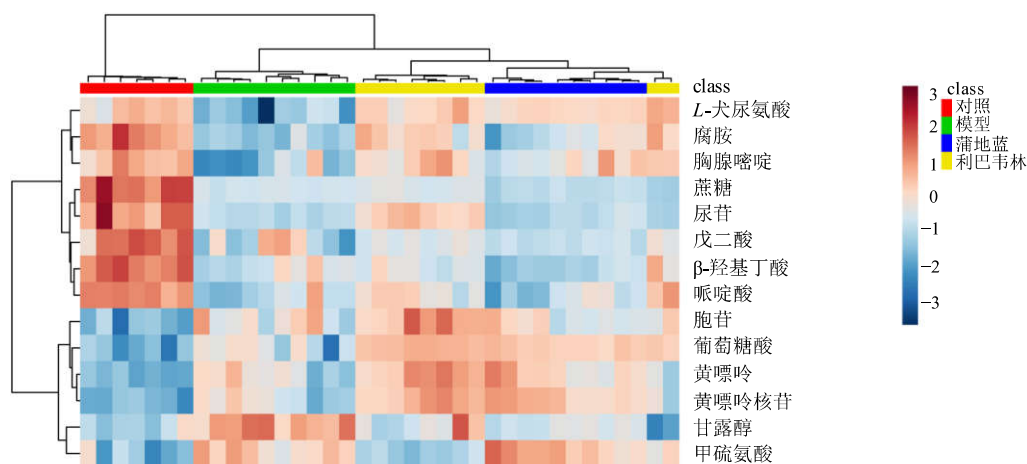
图 3 各组小鼠肺组织样本 PCA (A) 及 PLS-DA 得分图 (B)

Fig. 3 PCA (A) and PLS-DA score plot (B) of lung of mice in each group

表 1 H1N1 流感病毒性肺炎潜在疾病生物标志物

Table 1 Potential biomarkers of H1N1-induced pneumonia

| 代谢物名称          | Fold Change | VIP      | P 值 (对照 vs 模型) | HMDB      | PubChem | KEGG   |
|----------------|-------------|----------|----------------|-----------|---------|--------|
| 胞苷             | 2.729 400   | 1.226 16 | $<0.001$       | HMDB00089 | 6 175   | C00475 |
| 葡萄糖酸           | 3.020 300   | 1.072 80 | 0.048          | HMDB00625 | 10 690  | C00257 |
| 甘露醇            | 1.892 700   | 1.015 67 | $<0.001$       | HMDB00765 | 6 251   | C00392 |
| 甲硫氨酸           | 1.500 600   | 1.111 81 | $<0.001$       | HMDB00696 | 6 137   | C00073 |
| 黄嘌呤            | 5.339 700   | 1.000 13 | 0.001          | HMDB00292 | 1 188   | C00385 |
| 黄嘌呤核苷          | 2.312 000   | 1.014 97 | $<0.001$       | HMDB00299 | 64 959  | C01762 |
| $\beta$ -羟基丁酸  | 0.424 340   | 1.186 35 | $<0.001$       | HMDB00357 | 441     | C01089 |
| 戊二酸            | 0.291 910   | 1.098 02 | 0.002          | HMDB00661 | 743     | C00489 |
| <i>L</i> -犬尿氨酸 | 0.133 760   | 1.066 49 | $<0.001$       | HMDB00684 | 161 166 | C00328 |
| 腐胺             | 0.519 920   | 1.152 72 | $<0.001$       | HMDB01414 | 1 045   | C00134 |
| 嘧啶酸            | 0.583 910   | 1.088 65 | $<0.001$       | HMDB00070 | 849     | C00408 |
| 蔗糖             | 0.015 471   | 1.366 29 | $<0.001$       | HMDB00258 | 5 988   | C00089 |
| 胸腺嘧啶           | 0.441 100   | 1.051 02 | $<0.001$       | HMDB00262 | 1 135   | C00178 |
| 尿苷             | 0.072 982   | 1.222 86 | 0.002          | HMDB00296 | 6 029   | C00299 |



热图中的每个方格代表某一代谢物在各组样本相应强度值, 红色代表浓度上升, 蓝色代表浓度下降  
Each square in the heatmap represents the corresponding intensity value of a metabolite of samples in each group, red represents the increase in concentration and blue represents the decrease in concentration

图 4 与 H1N1 流感病毒性肺炎相关的肺组织代谢物的热图

Fig. 4 Heatmap of metabolites associated with H1N1-induced pneumonia

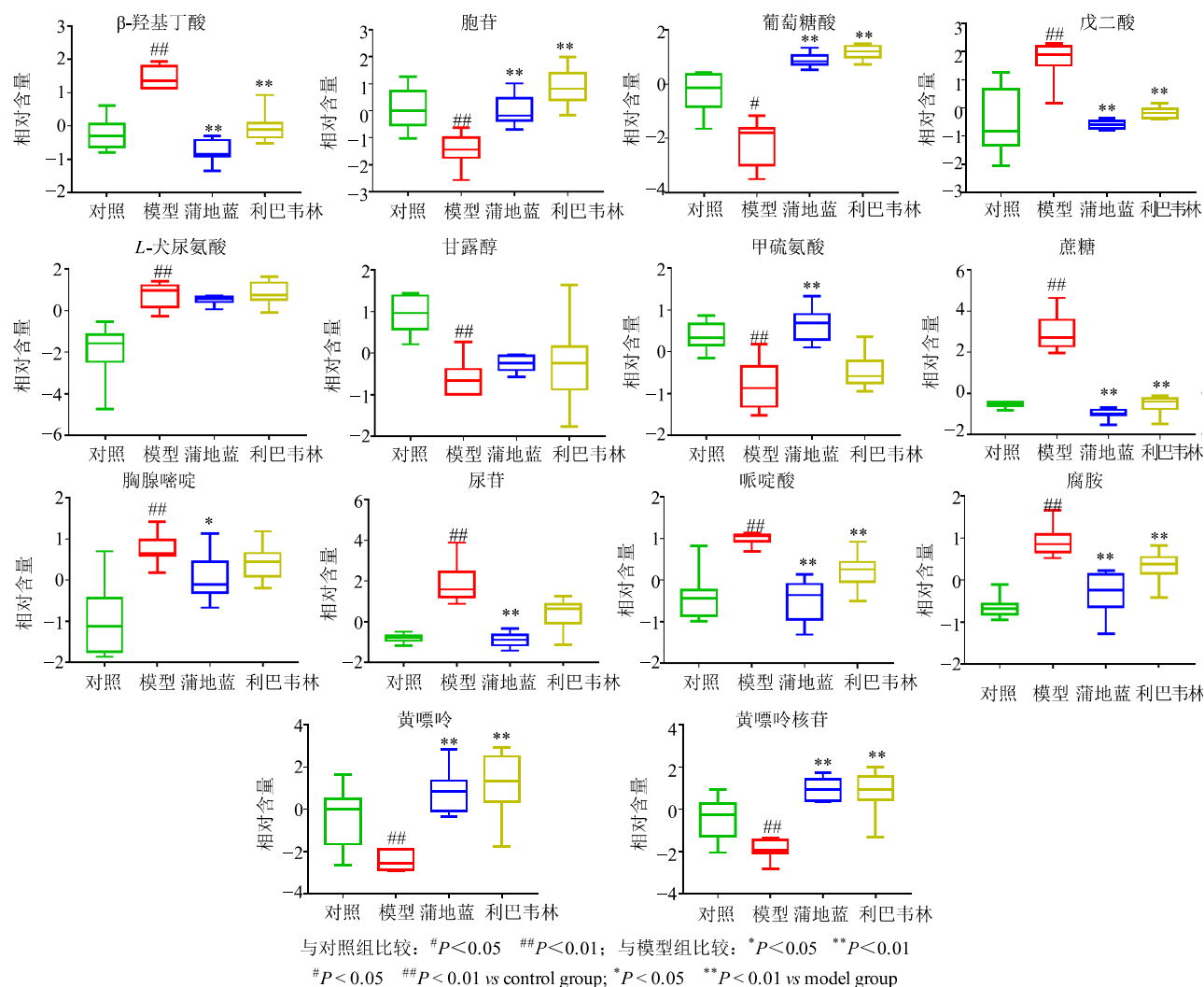


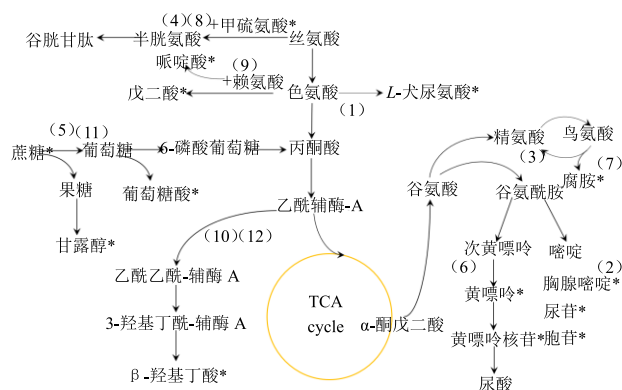
图 5 H1N1 流感病毒性肺炎疾病生物标志物归一化峰强度箱线图

Fig. 5 Box-whisker Plot of normalized peak intensity of potential biomarkers of H1N1-induced pneumonia



口服液的小鼠肺组织中, 除代谢物 *L*-犬尿氨酸的量与模型组相比略有回调但无统计学差异外, 其他 13 种代谢物均回调明显, 且与模型组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。推测蒲地蓝消炎口服液可能通过调节这 14 种代谢物水平及相关代谢通路, 发挥治疗甲型 H1N1 病毒性肺炎的作用。

将鉴定得到的差异性代谢物导入 Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 进行代谢通路富集分析, 共分析得到 12 条代谢通路: 色氨酸代谢、嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、半乳糖代谢、嘌呤代谢、谷胱甘肽代谢、氨酰-tRNA 生物合成、赖氨酸代谢、丁酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、酮体合成与分解。综合上述代谢通路及代谢物信息, 推测蒲地蓝消炎口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎相关代谢通路网络, 见图 6。



\*差异性代谢物 (1) 色氨酸代谢 (2) 嘧啶代谢 (3) 精氨酸和脯氨酸代谢 (4) 半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 (5) 半乳糖代谢 (6) 嘌呤代谢 (7) 谷胱甘肽代谢 (8) 氨酰-tRNA 生物合成 (9) 赖氨酸代谢 (10) 丁酸代谢 (11) 淀粉和蔗糖代谢 (12) 酮体合成与分解

\*significantly altered metabolites (1) tryptophan metabolism  
(2) pyrimidine metabolism (3) arginine and valine metabolism  
(4) cysteine and methionine metabolism (5) galactose metabolism  
(6) purine metabolism (7) glutathione metabolism (8) aminoacyl-tRNA  
biosynthesis (9) lysine metabolism (10) butanoate metabolism  
(11) starch and sucrose metabolism (12) synthesis and degradation  
of ketone bodies

图6 蒲地蓝消炎口服液治疗甲型H1N1流感病毒性肺炎相关代谢通路网络

**Fig. 6 Metabolic pathway network of H1N1-induced pneumonia**

甲硫氨酸是抗氧化物质谷胱甘肽和牛磺酸的前体物质<sup>[17]</sup>。谷胱甘肽可通过清除羟自由基及超氧化物保护宿主<sup>[18]</sup>。在 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组

组织中检测到甲硫氨酸含量较对照组降低,提示病毒性肺炎状态下细胞及组织受氧化损伤严重。而采用蒲地蓝消炎口服液及利巴韦林的小鼠肺组织中甲硫氨酸含量回调至正常水平,推测药物发挥一定的抗氧化作用从而保护机体,达到改善病毒性肺炎症状的作用。

在嘌呤代谢途径中, AMP、IMP、XMP、GMP 在脱氨酶的作用下分别生成腺苷、肌苷、黄嘌呤核苷、鸟苷, 最后通过相应酶反应生成黄嘌呤, 而黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶作用下的最终产物是尿酸<sup>[19]</sup>。研究表明, 机体组织缺氧环境下, 机体内嘌呤代谢加快<sup>[20]</sup>。由此推测本实验中小鼠在感染 H1N1 流感病毒后产生肺炎, 导致呼吸系统损伤, 从而使肺组织处在缺氧的状态下, 影响机体嘌呤代谢, 黄嘌呤等代谢物代谢紊乱。此外, 尿酸对血管细胞具有一定的促炎作用<sup>[21]</sup>。肺组织中血管丰富, 血管细胞在尿酸作用下炎症加剧, 从而加重病毒性肺炎。在使用蒲地蓝消炎口服液及利巴韦林后, 肺组织中黄嘌呤、黄嘌呤核苷回调至正常水平, 推测与肺组织缺氧状态改善有关。同时肺炎症状减轻可能与血管细胞炎症减轻有一定联系。

此外, H1N1 流感病毒性肺炎还引起机体内糖代谢的紊乱, 进而影响机体能量供应。推测蒲地蓝消炎口服液可能通过调节机体糖代谢参与机体修复, 改善肺炎症状。

## 4 讨论

本研究采用基于 GC-MS 技术的非靶向代谢组学技术,从小鼠肺组织部位的内源性代谢物变化角度,初步探讨了 H1N1 流感病毒性肺炎可能存在的发病机制及蒲地蓝消炎口服液抗病毒性的作用机制。本实验建立了具有良好区分度及预测性的 PLS-DA 模型对对照组、模型组、蒲地蓝组、利巴韦林组进行区分及预测。通过 3 种统计方法筛选出 14 种 H1N1 流感病毒性肺炎潜在的疾病生物标志物,并且分析出蒲地蓝消炎口服液和利巴韦林发挥抗炎、抗病毒疗效的代谢通路。结果表明,蒲地蓝消炎口服液对 H1N1 流感病毒性肺炎导致的小鼠肺组织相关代谢物的紊乱具有一定调节作用,推测蒲地蓝消炎口服液通过甲硫氨酸代谢、嘌呤代谢减轻病毒性肺炎小鼠肺组织的氧化损伤及血管细胞炎症,通过调节糖代谢参与机体修复,从而改善小鼠病毒性肺炎症状,为蒲地蓝消炎口服液治疗病毒性肺炎作用机制提供代谢组学方面的依据。

## 参考文献

- [1] König R, Stertz S, Zhou Y, *et al.* Human host factors required for influenza virus replication [J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 813-817.
- [2] Lu C, Jiang Z, Fan X, *et al.* A metabonomic approach to the effect evaluation of treatment in patients infected with influenza A (H1N1) [J]. *Talanta*, 2012, 100(20): 51-56.
- [3] Wang L, Zhang R M, Liu G Y, *et al.* Chinese herbs in treatment of influenza: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Respir Med*, 2010, 104(9): 1362-1369.
- [4] Sencanski M, Radosevic D, Perovic V, *et al.* Natural products as promising therapeutics for treatment of influenza disease [J]. *Current Pharm Design*, 2015, 21(38): 5573-5588.
- [5] 孙淑兰, 郝晓东, 孙红玲, 等. 不同剂量蒲地蓝消炎口服液治疗小儿急性上呼吸道感染疗效观察 [J]. 吉林医学, 2013, 34(25): 5204-5206.
- [6] 冀英. 蒲地蓝消炎口服液治疗儿童甲型 H1N1 流行性感冒 83 例 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(23): 2925-2926.
- [7] 吴璇, 于莉, 胡涛, 等. 蒲地蓝消炎口服液对呼吸道合胞病毒和腺病毒的体外抗病毒作用 [J]. 实用医学杂志, 2015(11): 1838-1840.
- [8] Weng R, Shen S, Tian Y, *et al.* Metabolomics approach reveals integrated metabolic network associated with serotonin deficiency [J]. *Sci Rep*, 2015(5): 11864.
- [9] 李维薇, 杨燕, 汪受传, 等. 细胞代谢组学研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(2): 187-192.
- [10] 彭琳秀, 陈良慧, 狄留庆, 等. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术的复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1964-1970.
- [11] 毛庆草, 单进军, 吴皓, 等. 代谢组学在中药及其复方领域中的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(2): 197-200.
- [12] 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.
- [13] 孟欣, 汪受传, 单进军, 等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4408-4415.
- [14] Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, *et al.* FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Analyt Chem*, 2009, 81(24): 10038-10048.
- [15] Cui L, Fang J, Ooi E E, *et al.* Serial metabolome changes in a prospective cohort of subjects with influenza viral infection and comparison with dengue fever [J]. *J Proteom Res*, 2017, 16(7): 2614-2622.
- [16] Cui L, Zheng D, Lee Y H, *et al.* Metabolomics investigation reveals metabolite mediators associated with acute lung injury and repair in a murine model of influenza pneumonia [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 26076.
- [17] Dash P K, Hergenroeder G W, Jeter C B, *et al.* Traumatic brain injury alters methionine metabolism: Implications for pathophysiology [J]. *Front Syst Neurosci*, 2016(10): 36.
- [18] Chen Y, Dong H, Thompson D, *et al.* Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60(10): 38-44.
- [19] Jin M, Yang F, Yang I, *et al.* Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases [J]. *Front Biosci*, 2012, 17(1): 656-669.
- [20] Del castillo velasco-martinez I, Hernandez-camacho C J, Mendez-rodriguez 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 Part A Mol Integr Physiol*, 2016, 191: 196-201.
- [21] Long C L, Qin X C, Pan Z Y, *et al.* Activation of ATP-sensitive potassium channels protects vascular endothelial cells from hypertension and renal injury induced by hyperuricemia [J]. *J Hypert*, 2008, 26(12): 2326-2338.