

• 药理与临床 •

基于代谢组学的肝、肺纤维化“异病同治”科学内涵研究

常虹^{1,2}, 孟洪宇³, 王宇¹, 刘树民^{1*}

1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 包头医学院药学院, 内蒙古 包头 014060

3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100010

摘要:目的 应用代谢组学技术结合病理学研究, 探究肝、肺纤维化发生发展中共同生物标志物及其变化规律, 阐释肝、肺纤维化“异病同治”的科学内涵。方法 以苏木精伊红(HE)染色检测肝、肺纤维化大鼠动态病理变化, 并采用超高效液相色谱与四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)联用技术, 分析其尿液代谢表达谱的动态变化, 筛选分析影响肝、肺纤维化发生发展的共同潜在生物标志物及其变化规律, 并阐释其生物学意义。结果 肝、肺纤维化存在相似的病理转归及代谢轨迹变化。其尿液中共有 16 种相同差异代谢物, 其中肾上腺素红、5-L-谷酰基-牛磺酸等 9 种代谢物为关键生物标志物, 主要通过参与氧化损伤、炎症、促纤维化因子释放共同影响肝、肺纤维化的发生发展。结论 代谢组学分析揭示了肝、肺纤维化共同生物标志物及其相同变化规律, 从代谢物层面阐释其“异病同治”的科学内涵。

关键词: 代谢组学; 肝纤维化; 肺纤维化; 异病同治; 代谢表达谱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-5116-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.024

Scientific connotation of TCM theory of “homotherapy for heteropathy” in treatment of liver and pulmonary fibrosis based on metabonomics

CHANG Hong^{1,2}, MENG Hong-yu³, WANG Yu¹, LIU Shu-min¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Inner Mongolia, Baotou 014060, China

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100010, China

Abstract: Objective Urinary metabolomics associated with the histological progression of liver fibrosis (LF) and pulmonary fibrosis (PF) were utilized to explore common differential metabolites and their associated changes, and to explain the scientific connotation of the traditional Chinese medicine (TCM) theory of “homotherapy for heteropathy”. **Methods** HE staining was used to monitor the histopathological changes in rats with LF and PF. Urinary metabolic profiling was performed by UPLC-Q-TOF/MS to analyze the metabolic profiles of LF and PF, as well as to clarify the common differential metabolites and their dynamic changes in LF and PF progression. **Results** Similar pathologic processes and trajectories of the PLS-DA score plots were observed in both the LF and PF models. Furthermore, 16 differential urine metabolites were found both in LF and PF. Among these, nine metabolites, including adrenochrome and 5-L-glutamyl-taurine, were key biomarkers which affect the development of LF and PF through oxidative damage, inflammation, and release of profibrogenic cytokines. **Conclusion** Metabonomic analysis revealed that LF and PF share common differential metabolites with the same changing trends and explained the scientific connotation of the TCM theory of “homotherapy for heteropathy”.

Key words: metabonomics; liver fibrosis; pulmonary fibrosis; homotherapy for heteropathy; metabolic profiling

“异病同治”是中医学诊治的精髓思维之一, 体现了中医辨证论治特色和病证结合的重要思想。当不同的疾病在其发展过程中, 出现了相同的病机, 可

以辨证为相同的证候, 因而可采用同一方法治疗^[1-2]。中医学认为肝、肺纤维化虽发病位不同, 但其病因病机有着共同的特点和发病规律及其转归, 即存

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: 国家重点基础研究发展(“973”)计划 2013(CB531800); 内蒙古自然科学基金项目(2017MS0813); 包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-QM 201652)

作者简介: 常虹(1985—), 女, 博士, 研究方向为临床中药学。Tel: (0451)82193278 E-mail: changhong_cool@163.com

*通信作者 刘树民(1963—), 男, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为临床中药学。Tel: (0451)82193278 E-mail: keji-liu@163.com

在相同“证”，均为毒邪-血瘀-络脉瘀滞的多环节，进展式病程，涉及“虚”“湿”“毒”“瘀”并贯穿疾病的始终，具有一致的证候表现；同时，现代医学研究也认为其发生发展存在一致的机制，均为致病因素-信号传导通路异常-细胞外基质（ECM）积聚，构成的复杂的分子网络系统。因此，从中西医角度（宏观、微观辨证）均说明肝、肺纤维化存在共性，即“证同”^[3]。根据中医辨证论治原则，则可采用“异病同治”的治则。揭示其“同证”的生物学基础及其规律来阐释“异病同治”的科学内涵，是目前需解决的关键问题。其对认识疾病本质，指导临床诊断，简化、优化疾病治疗有重要意义。研究认为“证”可由机体代谢或其网络的变化来表征^[4]。因此，肝、肺纤维化发展过程应有支撑“同证”表现的相同内源代谢物质改变。

代谢组学能够全面反映生物体在不同状态下代谢产物的变化，揭示生物体在特定时间和环境下的整体功能状态，从而揭示疾病发生发展的过程，具有整体、动态、综合分析的特点，与中医的整体观相吻合^[5]。凭借该优势，代谢组学已被广泛应用于中医药研究领域，为解释证候的生物学本质的重要有效手段^[6-7]。目前，在“异病同治”方面，已有研究者运用代谢组学技术揭示了不同疾病的相同证候在其代谢产物上有共性产物，即存在共同物质基础^[8-9]。但缺乏对这些代谢产物在证候中动态演变规律的研究，而这对全面、客观、真实揭示不同病症之间证候的本质，以及采取“同治”方法的药物靶点筛选具有重要指导意义。尿液是代谢物输出的最终途径，其代谢物的变化可以反映机体的整体代谢特点，且尿液样品的收集具有无创、操作简单易行等特点，易于进行疾病动态研究。因此，本研究基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术，对肝、肺纤维化大鼠进行尿液代谢组学分析，并结合病理学研究，探究肝、肺器官纤维化形成的共同的分子机制，揭示其相同内源物质及其动态变化规律，为中医“异病同治”理论奠定科学基础，提供证治依据，并为肝、肺纤维化发生发展机制、药物治疗靶点、疗效以及预后评估提供新的有价值的参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠，体质量 170~200 g，购自北京大学医学部（实验动物科学部），许可证号 SCXK（京）2011-0012。

1.2 试剂

CCl_4 （批号 20091217，天津市北方天医化学试剂厂）；特级初榨橄榄油（批号 20150123，山东鲁花集团有限公司）；博来霉素（批号 540402，日本化药株式会社）；色谱级乙腈、色谱级乙腈（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；屈臣氏蒸馏水；甲酸（色谱级，美国 Dikma Technologies 公司）；脑啡肽（美国 Sigma-Aldrich 公司）。

1.3 仪器

NP-T 生物组织自动脱水机、NP-B 型生物组织包埋机（孝感市诺普电子科技有限责任公司）；RM2235 切片机（德国徕卡公司）；CX31 显微镜（日本奥林巴斯公司）；Waters Acquity™ UPLC 超高压液相色谱仪、Waters Q-TOF 四极杆-飞行时间串联质谱仪（美国 Waters 公司）；KDC-160HR 高速冷冻离心机（科大创新有限公司）。

2 方法

2.1 肝纤维化及肺纤维化动物模型制备及分组

大鼠随机分为对照组（7 只）、肝纤维化模型组（24 只）、肺纤维化模型组（21 只）。大鼠肝纤维化造模方法参照文献方法^[10]，大鼠适应 1 周后，模型组大鼠按 3 mL/kg（首次 5 mL/kg）腹部 sc 40% CCl_4 橄榄油液，每周 2 次，持续 8 周；对照组 sc 等量橄榄油液。大鼠肺纤维化造模方法参照文献方法^[11]，经气管软骨环间隙一次性向气管内缓慢注入博来霉素（5 mg/kg）0.2 mL；对照组在相同条件下向气管内注入等量生理盐水。待动物自然清醒后置笼内常规饲养。观察大鼠一般情况及死亡情况，自由饮水、摄食。实验室温度为 21~27 °C，相对湿度为 30%~50%。

2.2 样本收集及处理

使用代谢笼收集对照组、肝纤维模型组、肺纤维化模型组大鼠每周尿液。尿液样品于 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，最后的上清液储存于液氮中。肝纤维化模型组于实验第 2、4、6、8 周分别随机取 5 只大鼠，麻醉处死后于肝右叶中部切取 1.0 cm×1.0 cm×0.3 cm 大小肝组织块置于多聚水合氯醛中固定；肺纤维化模型组于造模后第 1、3、5 周分别随机取 5 只大鼠，麻醉处死后，取右肺下叶灌注 10%福尔马林溶液使胸膜展平后将其浸在福尔马林溶液中固定；对照组实验结束取其肺脏及肝脏进行固定；将固定的脏器进行石蜡包埋，常规切片，行 HE 染色。

2.3 组织病理学检查

取出浸于多聚甲醛的组织进行酒精脱水、透明、渗透,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4 μm ,进行 HE 染色。光镜下观察切片情况,描述肝脏及肺脏组织的病理变化,并对每只大鼠切片随机选 10 个视野进行胶原纤维增生程度的半定量分析。评分标准参照 Ishak^[12]、Szapiel^[13]评分系统。

2.4 尿液代谢组学分析

2.4.1 UPLC 条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~8 min, 2%~40% A; 8~10 min, 40%~98% A; 10~13 min, 98%~100% A; 体积流量 0.4 mL/min,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。

2.4.2 MS 条件 电喷雾离子源(ESI),采用正、负离子 W 模式检测,毛细管电压 1 500 V,样品锥孔电压 100 V,离子源温度 110 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂氮气流量 750 L/h,锥孔气流量 20 L/h。锁定质量溶液,采用美国 Waters 公司 LockSprayTM 校正系统进行在线质量校正。亮氨酸脑啡肽准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 556.277 1 及 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 554.261 5,锁定质量浓度为 1 ng/mL,体积流量为 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。扫描方式为全扫描,扫描范围为 m/z 100~1 500。

2.4.3 多元数据分析 原始数据使用 MassLynx V4.1 及 Marker Lynx 软件进行分析。每个离子的强度相对于总离子数进行归一化,并生成一个数据矩阵,其中包括了保留时间、 m/z 及归一化后的峰面积。该数据矩阵再使用 EZinfo 软件,采用无监督的主成分分析法(PCA)和有监督的偏最小二乘-判别分析法(PLS-DA)对获得的多维复杂数据进行降维处理。探讨肝、肺纤维化疾病进展轨迹。

对对照组和模型组采用正交偏最小二乘-判别分析法(OPLS-DA)的方法进行差异物质的筛选;根据变量投射重要性(VIP)-plot 的结果,筛选 VIP>3 且 t 检验 $P<0.05$ 的变量作为显著差异物质的候选变量;结合软件中代谢物数据库检索及 HMDB、MassBank、Metlin、KEGG 鉴定潜在生物标志物,并在此基础上筛选肝、肺纤维化共同生物标志物;利用 MetaboAnalyst software 3.0 进行热图聚类分析,表征差异物质在各组间变化趋势;使用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行统计学处理,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

3 结果

3.1 HE 染色及半定量分析结果

3.1.1 肝纤维化模型 对照组大鼠肝小叶结构正常,大鼠肝索及肝血窦由中央静脉向四周呈放射状排列。模型组大鼠随着疾病的进展,表现为不同程度的肝脏形态学的改变:第 2 周时,肝脏仅有些脂肪变性,并没有显著异常;4~6 周时,镜下可见炎性细胞浸润,汇管中央静脉纤维增生,在门管与门管之间及门管与中心静脉之间同时伴有明显的纤维桥连;第 8 周时,汇管区和小叶间有大量的粗大胶原纤维沉积,多数小叶结构破坏或消失并形成结节样的假小叶。结果见图 1 和 2。

3.1.2 肺纤维化模型 对照组大鼠肺内结构清晰;模型组第 1 周可见肺泡间隔水肿,肺泡壁增厚,肺泡腔内可见炎性细胞浸润,有少量胶原纤维增生;第 3 周大量的胶原纤维增生,至第 5 周可见大量成纤维细胞,出现弥漫性纤维化病变,肺纤维化瘢痕形成。结果见图 1 和 2。

3.2 纤维化模型大鼠尿液代谢组学研究

3.2.1 疾病进展轨迹 PLS-DA 分析 从图 3(A、B)

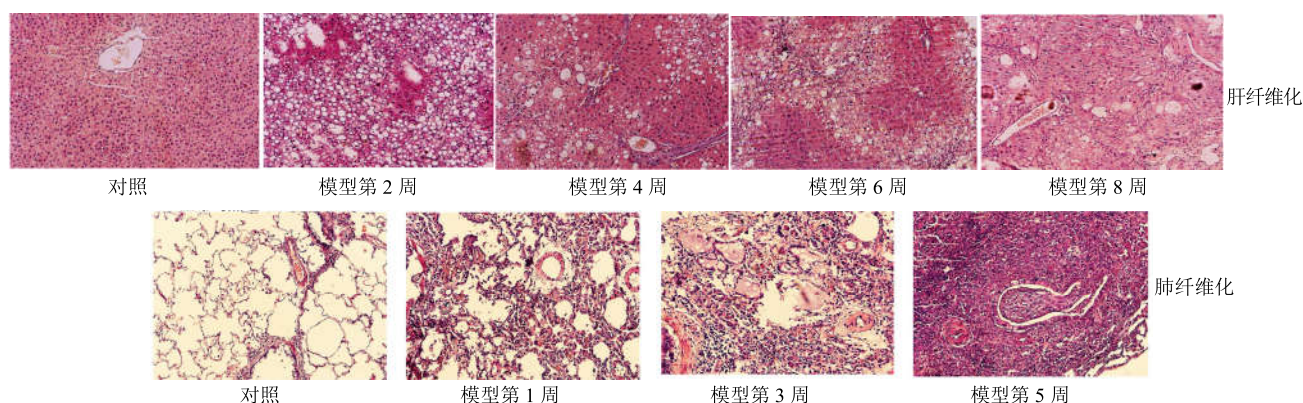
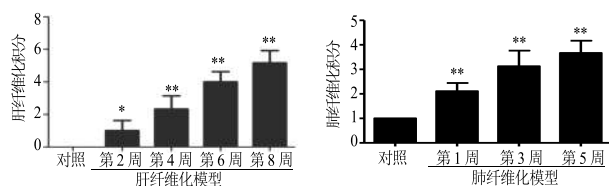


图 1 肝、肺纤维化大鼠疾病发展过程病理组织变化 ($\times 100$)

Fig. 1 Changes of histomorphology during LF and PF progression ($\times 100$)

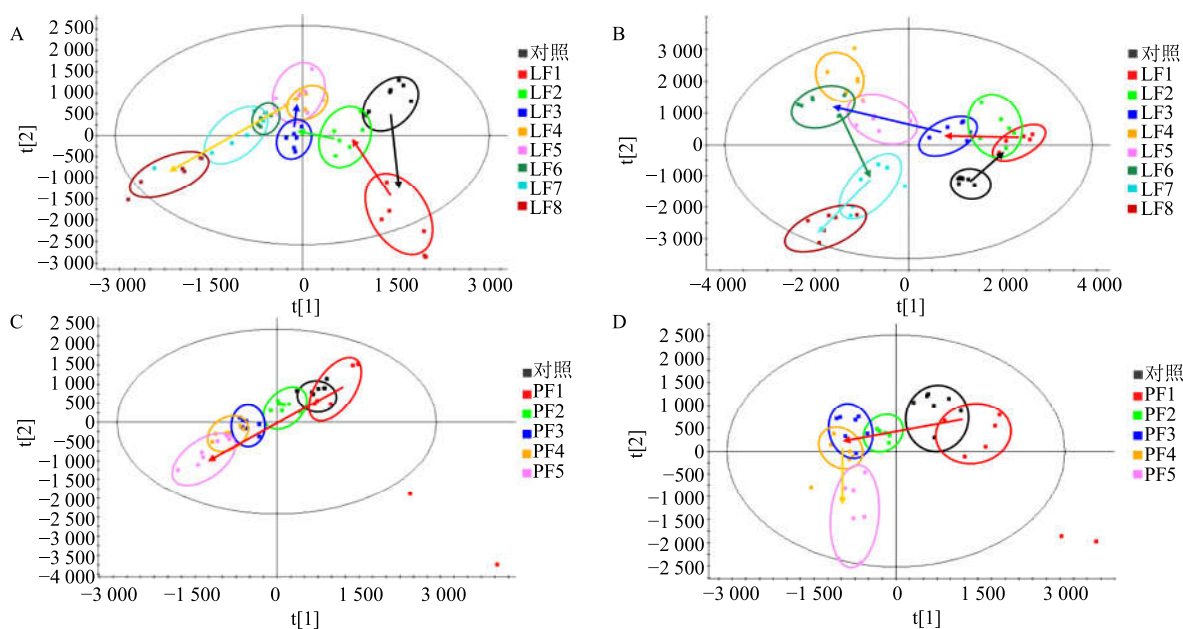


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 肝、肺纤维化大鼠病理积分结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Changes of histomorphology during LF and PF progression ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-肝纤维化大鼠正离子模式 B-肝纤维化大鼠负离子模式 C-肺纤维化大鼠正离子模式 D-肺纤维化大鼠负离子模式

LF1~LF8-肝纤维化造模第 1~8 周 PF1~PF5-肺纤维化造模第 1~5 周

A-LF rat model in positive ion mode B-LF rat model in negative ion mode C-PF rat model in positive ion mode

D-PF rat model in negative ion mode LF1~LF8-LF rat model at week 1~8 PF1~PF5-PF rat model at week 1~5

图 3 大鼠肝、肺纤维化疾病进展轨迹 PLS-DA 得分图

Fig. 3 Trajectory analysis of PLS-DA score plots for LF and PF progression

脏、肺脏持续进展的慢性损伤, 成功建立反映肝、肺纤维化疾病进展模型。

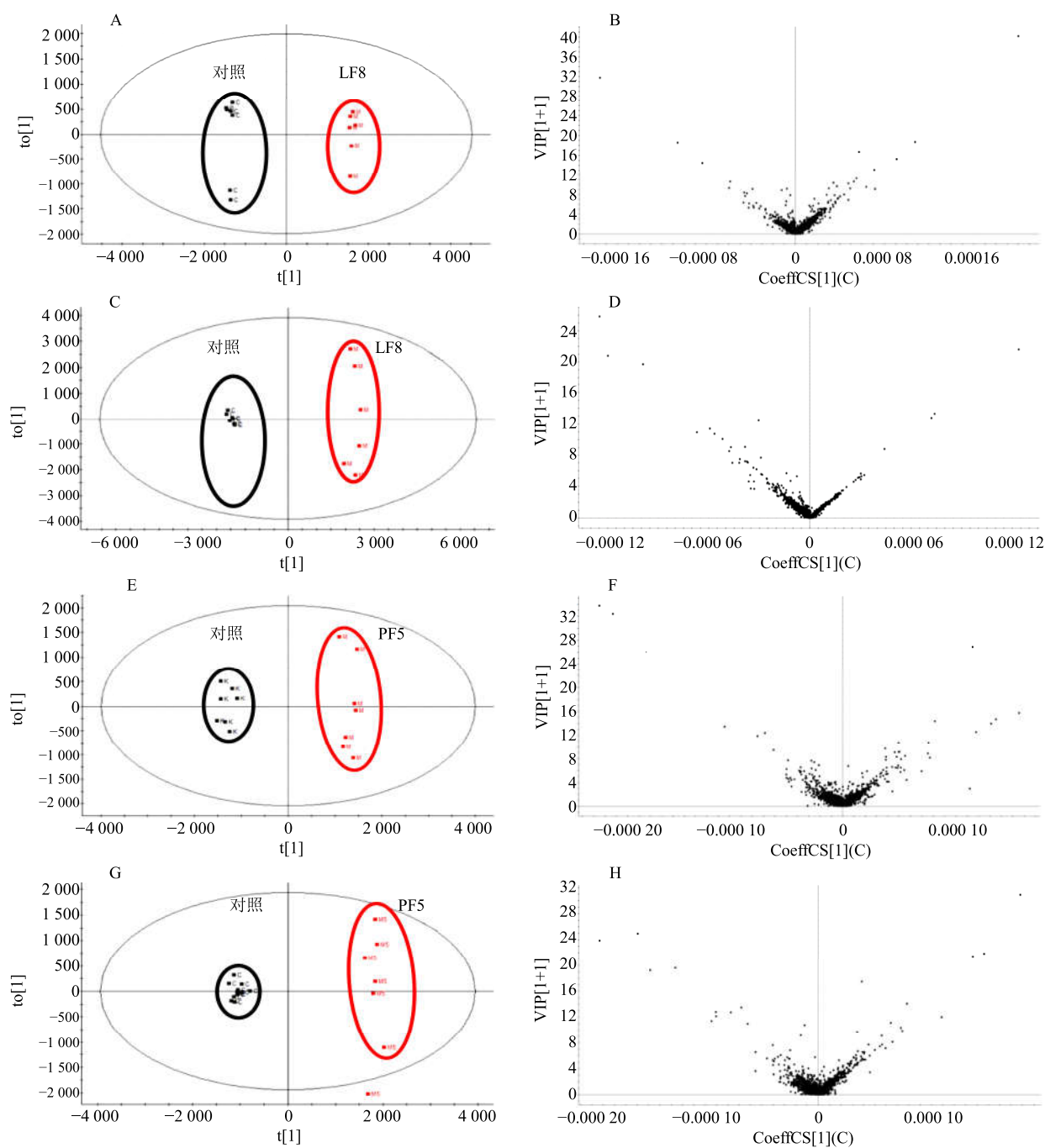
3.2.2 对照组与模型组 OPLS-DA 分析及差异代谢物的鉴定 对照组与肝纤维化模型组第 8 周及肺纤维化模型组第 5 周的正、负离子模式 OPLS-DA 得分图 4 (A、C、E、G) 显示, 对照组与模型组分离良好。通过其 VIP-plot 图 4 (B、D、F、H) 获取的差异变量, 并进一步筛选, 共得出 16 个共同影响肝、肺纤维化发生发展生物标志物 (表 1), 热图 (图 5) 展示了这 16 个差异代谢物在疾病发展不同时间点 (肝纤维化第 2、4、6、8 周; 肺纤维化第 1、3、5 周) 变化规律。

图 5 显示, 这些生物标志物除 3-甲基二氧吲哚

中可知, 肝纤维化模型组与对照组显著分离, 且模型组各时间点的大鼠代谢状态聚类效果良好, 随着造模时间的延长, 整个大鼠尿液代谢谱呈现顺序性的变化, 逐渐远离对照组。在正离子模式下, 趋势更加清晰明显, 2 种模式下均在第 8 周时达到了最大分离程度。图 3 (C、D) 显示, 肺纤维化大鼠其尿液代谢谱呈现相似顺序性的变化, 尤其在正离子模式下更为明显, 在第 5 周时达到了最大分离程度, 说明本实验 CCl_4 、博来霉素能够分别诱导大鼠肝

(3-methyldioxyindole)、尿酸 (uric acid)、顺乌头酸 (cis-aconitic acid) 在肝、肺纤维化疾病发展过程中表现为不同的上、下调变化趋势。其他差异代谢物变化趋势在肝、肺纤维化进展中均呈现相同趋势。其中, 3-甲基二氧吲哚在肝纤维化疾病进程 (从对照到 G8) 中逐渐下调, 而在肺纤维化进展 (从对照到 F5) 中逐渐上调; 尿酸、顺乌头酸随肝纤维化疾病进展呈现上调趋势, 而在肺纤维化疾病进展中呈现下调趋势。

从表 1 中筛选肝、肺纤维化大鼠尿液样本 VIP 值均大于 5 的差异代谢物, 作为密切影响疾病发生发展的关键潜在生物标志物包括肾上腺素红 (adrenochrome)、5-L-谷酰基-牛磺酸 (5-L-glutamyl-taurine)、3-甲基二



A、B-肝纤维化大鼠第 8 周正离子模式 C、D-肝纤维化大鼠第 8 周负离子模式 E、F-肺纤维化第 5 周大鼠正离子模式
G、H-肺纤维化第 5 周大鼠负离子模式

A, B-LF rat model at week 8 in positive ion mode C, D-LF rat model at week 8 in negative ion mode E, F-PF rat model at week 8 in positive ion mode G, H-PF rat model at week 8 in negative ion mode

图 4 肝、肺纤维化大鼠尿液 OPLS-DA 得分图及 VIP-plot 图

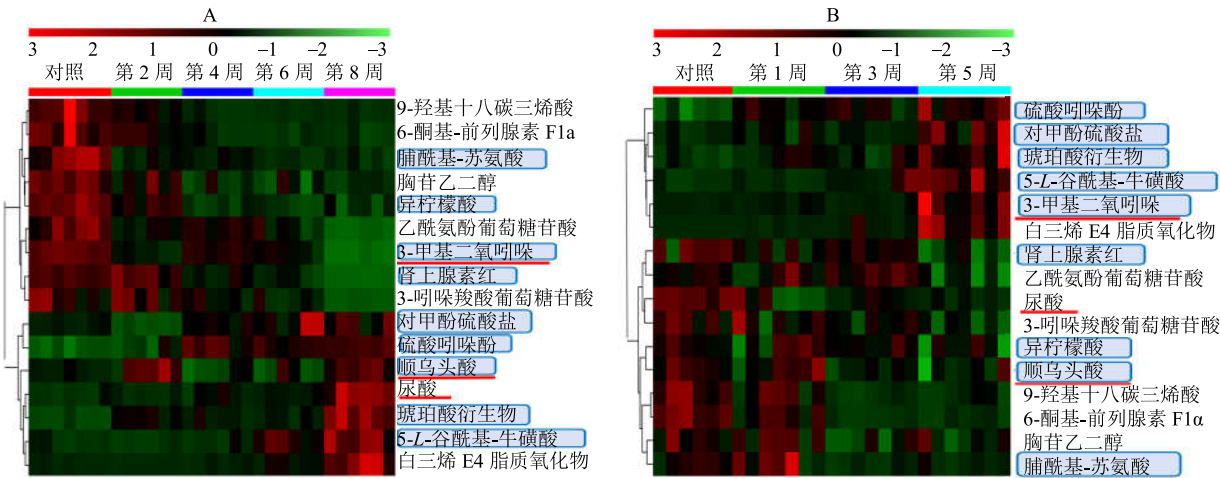
Fig. 4 OPLS-DA and VIP score plots of urine samples in LF and HF rat models

氧吡啶 (3-methyldioxyindole)、琥珀酸衍生物 (nonate), 对甲酚硫酸盐 (*p*-cresol sulfate)、顺乌头酸 (*cis*-aconitic acid)、异柠檬酸 (isocitric acid)、脯氨酰基-苏氨酸 (prolyl-threonine)、硫酸吡啶酚 (indoxyl

sulfate), 这些标志物除顺乌头酸在肺纤维化模型中呈下调趋势, 其余在 2 种模型大鼠尿液中均呈上调趋势。以上 16 种差异代谢物在肝、肺纤维化模型中代谢紊乱, 共同影响肝、肺纤维化的发生发展。

表 1 肝、肺纤维化共同尿液差异代谢物鉴定结果
Table 1 Results of common identified urinary metabolites between LF and PF

编号	肝纤维化			肺纤维化			HMDB ID	结构式	差异代谢物
	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	VIP	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	VIP			
1	263.14	3.48	17.63	253.05	6.03	12.12	HMDB04195	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₆ S	5- <i>L</i> -谷酰基-牛磺酸 (5- <i>L</i> -glutamyl-taurine)
2	305.10	2.49	10.41	357.11	3.19	30.87	HMDB12883	C ₉ H ₁₁ NO ₃	肾上腺素红 (adrenochrome)
3	174.11	3.79	10.13	217.12	1.38	10.14	HMDB29027	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₄	脯酰基-苏氨酸 (prolyl-threonine)
4	381.08	0.68	7.57	152.05	9.86	6.09	HMDB04186	C ₉ H ₉ NO ₂	3-甲基二氧吲哚 (3-methyl dioxy indole)
5	267.13	4.89	7.51	326.08	2.81	4.73	HMDB10316	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈	乙酰氨基葡萄糖苷酸 (acetaminophen glucuronide)
6	259.09	0.72	7.34	191.02	0.92	17.46	HMDB00193	C ₆ H ₈ O ₇	异柠檬酸 (isocitric acid)
7	215.02	0.92	4.74	396.15	4.22	4.82	HMDB12575	C ₁₉ H ₂₇ NO ₇ S	白三烯 E ₄ 脂质氧化物 (13 <i>E</i> -tetranor-16-carboxy-LTE ₄)
8	164.07	4.14	3.71	353.23	8.25	4.25	HMDB02886	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	6-酮基-前列腺素 F _{1α} (6-keto-prostaglandin F _{1α})
9	162.08	1.00	3.13	259.09	0.73	3.28	HMDB42036	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇	胸苷乙二醇 (thymidine glycol)
10	255.07	6.03	3.00	295.23	8.25	3.67	HMDB10224	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	9-羟基十八碳三烯酸 (9-HOTE)
11	313.24	9.72	19.40	212.00	3.23	23.86	HMDB00682	C ₈ H ₇ NO ₄ S	硫酸吲哚酚 (indoxyl sulfate)
12	187.10	5.37	7.14	187.10	5.37	5.26	HMDB11717	C ₉ H ₁₆ O ₄	琥珀酸衍生物 (nonate)
13	451.27	8.86	6.81	173.01	1.01	7.66	HMDB00072	C ₆ H ₆ O ₆	顺乌头酸 (<i>cis</i> -aconitic acid)
14	173.01	1.01	6.78	187.01	4.37	13.45	HMDB11635	C ₇ H ₈ O ₄ S	对甲酚硫酸盐 (<i>p</i> -cresol sulfate)
15	171.07	3.94	4.69	338.09	3.17	11.09	HMDB13189	C ₁₅ H ₁₅ NO ₈	3-吲哚羧酸葡萄糖苷酸 (3-indole carboxylic acid glucuronide)
16	160.04	3.69	3.91	188.99	2.50	21.80	HMDB00289	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸 (uric acid)



A-肝纤维化疾病进展动态变化 B-肺纤维化疾病进展动态变化 不同颜色-代谢物表达量 (绿-黑-红: 低-中-高), 红色下划线为不同变化趋势的生物标志物; 蓝色标注为 VIP 值均大于 5 的生物标志物
A-changes in LF progression B-changes in PF progression The degree of color saturation indicates metabolite expression value; green: lowest; red: highest; black: mean; The underline in red indicates the biomarkers with different changing trend; The mark in blue indicated the biomarkers with VIP values greater than 5

图 5 肝、肺纤维化共同差异代谢物在疾病发展过程中变化规律的层次聚类热图
Fig. 5 Heatmap of differential abundance levels for same metabolites in LF and PF progression

4 讨论

异病同治理论在肝、肺纤维化防治中具有重要意义,临床及众多实验研究发现同法同方同药干预肝、肺等多脏器纤维化可产生同样显著疗效,如复方鳖甲软肝片,单味药黄芩、黄芪等^[3,14],这也佐证了肝、肺等脏器纤维化应当存在共同物质基础,具有“异病同治”的特征。本研究通过代谢组学结合病理学研究,发现肝、肺纤维化发生发展机制、形成的病理过程、其内源性代谢物谱变化均存在一致的结果,从代谢物的层面阐释了肝、肺纤维化“异病同治”的科学内涵。

实验对比肝纤维化大鼠肝脏病理形态及肺纤维化大鼠肺脏病理形态,发现肝、肺纤维化存在相似的病理转归。早期,主要以诱发炎症为主,细胞结构损伤,但无明显的胶原纤维;中期,可见脏器正常结构紊乱,炎症细胞浸润,胶原纤维增生明显;晚期,大量细胞坏死,胶原纤维沉积严重,产生宽而致密的纤维。代谢组学轮廓分析同样证实了 2 种不同模型轨迹存在相似变化。

证候生物标志物能为中医疾病证候的诊断提供特异性指标,实现证候诊断及疗效评价的客观化和标准化^[15]。代谢组学是实现这一现代化研究的重要平台,应用该技术,对证候群的尿液或者血清样本进行代谢轮廓分析,可获取表征“证候”的客观生物标记物,进而揭示中医“证候”的本质^[16]。对于不同病症之间,寻找体现“同证”共性物质基础,进一步筛选共性生物标志物并揭示其机制,对“异病同治”的现代科学内涵研究及临床证候诊断治疗具有极为积极意义。本实验通过对肝、肺纤维化尿液差异代谢物进行筛选,发现有 16 种相同潜在生物标志物在疾病发展各阶段有不同幅度的上调或下调,共同影响肝、肺纤维化发生发展,其中肾上腺素红、5-*L*-谷酰基-牛磺酸、3-甲基二氧吲哚、琥珀酸衍生物、对甲酚硫酸盐、顺乌头酸、异柠檬酸、脯氨酰基-苏氨酸,这些差异代谢物较为关键。对这些关键潜在生物标志物与疾病的相关性和可能的作用机制进行分析,探讨其生物学意义,揭示其致病的可能机制。

肾上腺素红由肾上腺素氧化而来,又称肾上腺色素缩氨脲,具有收缩血管作用,其在细胞内形成过程参与谷胱甘肽(GSH)代谢,可与 GSH 结合,导致 GSH 耗竭,造成活性氧(ROS)大量聚集^[17-18],加速肝、肺纤维化进程。

5-*L*-谷酰基-牛磺酸由牛磺酸转化而来,牛磺酸能够促进各种离子的运输如钠、钾、钙和镁,参与渗透调节调控,稳定在骨骼肌膜电位,并有抗氧化和抗炎作用,对肺损伤有保护作用^[19-20]。研究证明牛磺酸能够抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)通路激活,从而抑制促炎和促纤维细胞因子的释放^[21]。并且牛磺酸可通过减少氧化应激及抑制肝星状细胞(HSC)活化,延缓 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化发生发展^[22]。相对应的,它的缺乏也会造成机体非特异的、慢性的损伤及炎症的发生,从而促进纤维化进程。本实验肝、肺纤维化模型组大鼠尿液中 5-*L*-谷酰基-牛磺酸水平均显著升高,意味着牛磺酸向其转化增多而含量降低,促使纤维化发生发展。

3-甲基二氧吲哚是由 *L*-色氨酸的代谢物 3-甲基吲哚(3-MI)氧化形成,是其重要的尿液代谢物。3-MI 及其代谢物能够诱发 DNA 损伤,抑制脂质过氧化,减少 GSH 含量^[23-24]。肺毒素 3-MI 的产生主要是由呼吸道中 P450 酶表达^[25],其作为肺炎球菌毒素能引起人类呼吸道疾病,同时也有研究证明,相对于正常人,肝脏病患者的 3-MI 含量高,并通过体外研究证实了 3-MI 及其一些代谢物能够影响肝功能^[26]。因而,3-甲基二氧吲哚代谢紊乱反映肝、肺脏器损伤。

Nonate 为琥珀酸(succinate)的衍生物,琥珀酸是三羧酸循环的中间体,同时也是细胞外信号分子,它能够结合 HSC 上的特定 G 蛋白耦合受体 91(GPR91)。因此,高表达的琥珀酸可以激活 HSC,同时增加 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 表达,转化生长因子- β (TGF- β)的释放,增加胶原蛋白 I 型的合成,促使肝纤维化发生发展^[27-28]。

对甲酚硫酸盐是对甲酚的次生代谢物,作为一种微生物代谢物存在于尿液当中。在多发性硬化症患者中会显著升高,与硫酸吲哚酚同为尿毒症毒素,它与心血管疾病及氧化损伤密切相关。研究表明,硫酸吲哚酚和对甲酚硫酸盐能够增加 TGF- β 1 的表达促进肾小管间质纤维化^[29]。

综上所述,本研究发现肝、肺纤维化发生发展机制,形成的病理过程,与机体代谢轮廓变化均存在一致的结果。证实了两种“病”存在相同生物标志物及相同变化趋势,主要涉及氧化损伤、炎症、促纤维因子的释放,这些共同差异物作为肝、肺纤维化的共同的物质基础阐释其“证”同,并为肝、肺纤维化“异病同治”理论科学性提供客观依据。

同时为采用“同治”方法干预肝、肺纤维化提供治疗靶点。此外,实验结果表明存在其他不同生物标志物及相同生物标志物不同的变化规律及影响程度,推测这些即为“病”异的客观体现。由于病证的复杂性,肝纤维化和肺纤维化二者之间的其他特异性生物标志物的异同、关联,以及实验与临床之间的差异有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 牛建昭,姜术霞,李 戡.多脏器纤维化的络病机制探讨[J].北京中医药大学学报,2004,27(6):4-6.
- [2] 张东伟,牛建昭,陈家旭.异病同治理论在中医研究中的应用的思考[J].世界科学技术—中医药现代化,2003,5(6):16-21.
- [3] 常 虹,郭 凯,孟洪宇,等.中医异病同治理论治疗多器官纤维化的科学基础评述[J].中华中医药学刊,2017,35(4):849-851.
- [4] 罗和古,陈家旭.代谢组学技术与中医证候的研究[J].中国中医药信息杂志,2007(5):3-5.
- [5] 黄晓晨,宿树兰,郭建明,等.代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考[J].中草药,2014,45(2):147-153.
- [6] 赵超群,刘 畅,刘 平,等.基于代谢组学方法的中医证候分类研究进展[J].世界中医药,2017,12(4):956-960.
- [7] 贾 敏,苗 阳,高铸焯.代谢组学技术在证候研究中的应用进展[J].世界中医药,2015,10(9):1457-1460.
- [8] 黄亚丽,张 静,戚秀中,等.基于代谢组学分析冠心病和肝硬化血瘀证“异病同治”的物质基础[J].现代中西医结合杂志,2017,26(19):2053-2056.
- [9] 赵 铁,殷婷婷,张英泽,等.基于代谢组学的强直性脊柱炎和痛风性关节炎湿热证共性特征研究[J].中医杂志,2013,54(7):592-596.
- [10] Zhao Y, Ma X, Wang J, *et al.* Curcumin protects against CCl₄-induced liver fibrosis in rats by inhibiting HIF-1 α through an ERK-dependent pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18767-187680.
- [11] Jin X, Dai H, Ding, K, *et al.* Rapamycin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats and the expression of metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in lung tissue [J]. *Chin Med J*, 2014, 127(7): 1304-1309.
- [12] Goodman Z D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(4): 598-607.
- [13] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [14] 赵宗江,刘 昆,张新雪,等.异病同治和同病异治理论在多器官纤维化防治中的应用[J].中医杂志,2005,46(10):727-729.
- [15] 雒岁芳,宋小莉,庞小刚,等.蛋白质组学应用于中医虚证研究进展[J].山东中医药大学学报,2017,41(1):91-93.
- [16] 王芹芹,张芳梅,王喜军.基于代谢组学的中医证候本质研究进展[J].世界科学技术—中医药现代化,2011,13(3):541-545.
- [17] Costa V M, Silva R, Ferreira L M, *et al.* Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: Formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(8): 1183-1191.
- [18] Heacock R A, Mattok G L. The reaction of adrenochrome with glutathione [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1964, 107(2): 352-353.
- [19] Zhang Z H, Wei F, Vaziri N D, *et al.* Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep14472.
- [20] Men X, Han S, Gao J, *et al.* Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Acta Orthop*, 2010, 81(2): 263-267.
- [21] Gurujeyalakshmi G, Wang G Y, Giri S N. Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor- κ B in mice [J]. *J Pharmacol Exper Therap*, 2000, 293(1): 82-90.
- [22] Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, *et al.* Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 117-125.
- [23] Bray M T, Kubow S. Involvement of free radicals in the mechanism of 3-methylindole-induced pulmonary toxicity: An example of metabolic activation in chemically induced lung disease [J]. *Envir Health Persp*, 1985, 64(4): 61-67.
- [24] Weems J M, Cutler N S, Moore C, *et al.* 3-methylindole is mutagenic and a possible pulmonary carcinogen [J].

- Toxicol Sci*, 2009, 112(1): 59-67.
- [25] D'Agostino J, Zhuo X, Shadid M, *et al.* The pneumotoxin 3-methylindole is a substrate and a mechanism-based inactivator of CYP2A13, a human cytochrome P450 enzyme preferentially expressed in the respiratory tract [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(10): 2018-2027.
- [26] Rasmussen M K, Balaguer P, Ekstrand B, *et al.* Skatole (3-methylindole) is a partial aryl hydrocarbon receptor agonist and induces CYP1A1/2 and CYP1B1 expression in primary human hepatocytes [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): 154629-154646.
- [27] Li Y H, Woo S H, Choi D H, *et al.* Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 853-858.
- [28] Paulo Renato A V C, Emma A K, Mayerson T, *et al.* Succinate is a paracrine signal for liver damage [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(2): 262-269.
- [29] Zhao Y Y, Cheng X L, Wei F, *et al.* Intrarenal metabolomic investigation of chronic kidney disease and its TGF-beta1 mechanism in induced-adenine rats using UPLC Q-TOF/HSMS/MS(E) [J]. *J Proteom Res*, 2013, 12(2): 692-703.