• 药理与临床 •

基于血浆代谢组学的蒙药三臣小儿退热贴膏解热作用机制研究

立 新[1, 2]，奥•乌力吉[1, 3*]，那仁满都拉[4*]

1. 内蒙古民族大学蒙医药学院，内蒙古 通辽 028000
2. 内蒙古民族大学附属医院，内蒙古 通辽 028000
3. 内蒙古蒙医药工程技术研究院，内蒙古 通辽 028000
4. 浙江大学医学院，浙江 杭州 310000

摘 要：目的 基于血浆代谢组学探究蒙药三臣小儿退热贴膏的解热作用及其机制。**方法** SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阿司匹林（100 mg/kg）组以及三臣小儿退热贴膏高、中、低剂量（16、8、4 mg/kg）组和空白基质贴膏组，模型组和各给药组采用干酵母法建立发热模型，造模后第 4、7 小时各给药组给予相应药物进行干预，造模后每小时测量 1 次大鼠体温。采集造模后 10 h 大鼠血浆，采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱（UPLC-QE-MS）法并结合多元统计分析，检测各组大鼠血浆代谢相关生物标志物的变化。**结果** 造模 4 h 后模型组大鼠体温显著升高（$P<0.01$），造模后 5 h 三臣小儿退热贴膏组大鼠体温显著降低（$P<0.01$），呈剂量相关性。基于代谢组学发现模型组大鼠血浆中 7 种潜在的生物标志物发生明显变化，分别为酮亮氨酸、鞘磷脂[d17∶1/24∶1 (15*Z*)]、鞘磷脂[d18∶1/24∶1 (15*Z*)]、鞘磷脂[d18∶1/18∶1 (9*Z*)]、磷脂酰胆碱（16∶0/14∶0）、磷脂酰胆碱（18∶0/15∶0）、磷脂酰胆碱（16∶0/16∶0）；三臣小儿退热贴膏组大鼠血浆中上述 7 种生物标志物含量均显著回调，且牛磺酸和异柠檬酸含量升高。代谢通路分析显示，三臣小儿退热贴膏能够影响牛磺酸和亚牛磺酸代谢、乙醛酸和二元酸代谢、柠檬酸循环、氨基酸代谢、初级胆汁酸生物合成、α-亚麻酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、鞘脂代谢等多种代谢通路。**结论** 三臣小儿退热贴膏对干酵母致发热大鼠模型具有较好的解热作用，其药效与阿司匹林相当，其解热机制与酶抑制、脂肪代谢、氨基酸及能量代谢等多通路协同作用有关。

关键词：三臣小儿退热贴膏；解热；生物标志物；代谢组学；酮亮氨酸；鞘磷脂；磷脂酰胆碱

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2021)18 - 5581 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.012

Antipyretic mechanism of Mongolian medicine Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster based on plasma metabolomics

LI Xin[1, 2], AO·Uliji[1, 3], NARENMANDULA Hua[4]

1. School of Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China
2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China
3. Inner Mongolia Research Institute of Traditional Mongolian Medicine Engineering Technology, Tongliao 028000, China
4. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China

Abstract: Objective To explore the antipyretic effect and mechanism of Mongolian medicine Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster (三臣小儿退热贴膏) based on plasma metabolomics. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, aspirin (100 mg/kg) group, high-, medium-, low-dose Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster (16, 8, 4 mg/kg) groups and blank matrix plaster group, fever models were established in model group and each administration group by dry yeast method. At 4th and 7th hours

收稿日期：2021-02-10

基金项目：内蒙古自治区科技重大专项（蒙医药现代化关键技术研究及蒙药产业化）；内蒙古自治区人民政府蒙医药标准化项目（2020-MB018）；国家自然科学基金资助项目（81872942）

作者简介：立 新（1972—），男，蒙古族，博士，副主任蒙药师，研究方向为蒙药和方剂质量标准及新药研发。Tel: 15847525822 E-mail: lixin2011ok@163.com

***通信作者：**奥•乌力吉，蒙古族，教授，博士生导师，主要从事蒙药和制剂质量标准及新药研发。E-mail: wuliji@126.com

那仁满都拉，蒙古族，教授，博士生导师，主要从事药物毒理学和血液药理学研究。E-mail: narenman@zju.edu.cn

after modeling, rats in each administration group were given corresponding drugs for intervention, and body temperature was measured every hour after modeling. Plasma were collected after 10 h of modeling, and ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-QE-MS) combined with multivariate statistical analysis were used to detect the changes of biomarkers related to plasma metabolism in rats of each group. **Results** Body temperature of rats in model group was significantly increased after 4 h of modeling ($P < 0.01$), and body temperature of rats in Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster group was significantly decreased after 5 h of modeling ($P < 0.01$), showing a dose-related relationship. Seven potential biomarkers in plasma of rats in model group had significant changes based on metabonomics, respectively ketoleucine, sphingomyelin [d17 : 1/24 : 1(15*Z*)], sphingomyelin [d18 : 1/24 : 1(15*Z*)], sphingomyelin [d18 : 1/18 : 1(9*Z*)], phosphatidylcholine (16 : 0/14 : 0), phosphatidylcholine (18 : 0/15 : 0), phosphatidylcholine (16 : 0/16 : 0); Contents of above seven biomarkers in plasma of rats in Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster group were significantly recovered, contents of taurine and isocitrate were increased. Metabolic pathway analysis showed that Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster affected taurine and hypotaurine metabolism, glyoxylic acid and dibasic acid metabolism, citric acid cycle, amino acid metabolism, primary bile acid biosynthesis, α-linolenic acid metabolism, niacin and nicotinamide metabolism, sphingolipid metabolism and other metabolic pathways. **Conclusion** Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster has a good antipyretic effect on dry yeast-induced fever rats model, and its efficacy is equivalent to aspirin, its antipyretic mechanism is related to multiple pathways such as enzyme inhibition, fat metabolism, amino acid and energy metabolism.

Key words: Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster; antipyretic; biomarker; metabolomics; ketoleucine; sphingomyelin; phosphatidylcholine

发热是指当机体体温中枢功能障碍或受到致热源侵袭时，体温升高超过正常范围的现象，是人体常见的一种症状。在体温调节中枢作用下，正常成年人机体的产热和散热处于动态平衡，而婴幼儿体温调节功能尚未完全发育成熟，在受到致热源侵袭时容易引起发热症状[1]。因此，发热是儿科最常见病症之一。在一定限度内的发热是机体抵抗疾病的生理性保护机制，可增强机体抗感染能力，若长期处于超高热状态，不仅使机体免疫功能下降，同时也对各组织、脏器造成损害，尤其易诱发婴幼儿惊厥等病症，甚至会产生器官衰竭等不可逆转的危害，威胁婴幼儿生命安全[2]。

蒙药三臣丸出自《四部医典》[3]，又名图喜木勒-3，由天竺黄、红花和牛黄 3 味中药组成，具有清热、解毒、止咳、镇惊的功效。三臣丸组方性凉，临床上主要用于治疗儿童肺热、肝热、惊悸等症[4-5]。由于具有良好的解热功效，三臣丸在蒙医临床中常作为小儿发热的首选药[6-8]。从现代研究的处方成分分析，三臣丸中的 3 味药材均具有解热、镇痛、抗炎的功效，可提高机体免疫功能，对多数的发热均具有解热、抗炎作用[9-10]。目前该制剂有散剂和水丸 2 种剂型[11]，但均不便于患儿服用，患者依从性较差，影响药物疗效。本研究将三臣丸改进为儿童易于接受的凝胶贴膏剂，采用干酵母致大鼠发热模型评价三臣小儿退热贴膏的解热作用；同时采用代谢组学技术，通过检测血浆代谢物探究三臣小儿退热贴膏对干酵母致大鼠发热模型的解热机制，以期为临床治疗小儿发热提供新的外用药物。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠，6 周龄，体质量（200±20）g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，动物许可证号 SCXK（辽）2015-0001。大鼠分笼饲养，6 只/笼，室温（25±2）℃、湿度（65±10）%，通风及光照条件良好，自由进食饮水。动物实验经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会批准（批准号 NM-LL-2020-05-10-01）。

1.2 药材

红花（产地为新疆，批号 20201105）购自安徽中美堂中药饮片有限公司，天竺黄（产地为云南，批号 20201105）购自安徽省金芙蓉中药饮片有限公司，人工牛黄（批号 201002）购自四川费德力制药有限公司，经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药教研室布和巴特尔教授鉴定，红花为菊科植物红花 *Carhamus tinctorius* L.的干燥花，天竺黄为禾本科植物青皮竹 *Bambusa textilis* McClure 杆内的分泌液干燥后的块状物，人工牛黄为由牛胆粉、胆酸、去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成。

1.3 药品与试剂

活性干酵母粉（批号 20200106W）购自安琪酵母股份有限公司；氯化钠注射液（批号 20191203）购自山东华鲁制药有限公司；硫化钠（批号 20180901）购自山东西亚化学工业有限公司；阿司匹林肠溶片（100 mg/片，批号 BJ50742）购自德国 Bayer 公司；甘油（批号 20200715）购自辽宁泉瑞

试剂有限公司；聚丙烯酸钠（批号 20P46NF110）购自上海冠英生物科技有限公司；酒石酸（批号 20180623）购自天津天力化学试剂有限公司；氮酮（批号 07969700408）购自临沂市绿森化工有限公司；LC-MS 级乙腈、甲醇购自德国 CNW Technologies GmbH 公司；LC-MS 级乙酸铵购自美国 Sigma 公司；LC-MS 级氨水购自美国 Fisher Chemical 公司；超纯水购自屈臣氏。

1.4 仪器

Vanquish 超高效液相色谱仪、QExactive HFX 高分辨质谱仪、Heraeus Fresco 17 型离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BSA124S-CW 型天平（德国 Sartorius 公司）；PS-60AL 型超声仪（深圳市雷德邦电子有限公司）；HZ85-2 型磁力搅拌器（北京中兴伟业仪器有限公司）；DT580 型实验室涂布机（北京信义惠达机电设备有限公司）；宠物用电推剪（深圳科德士电器有限公司）；电子体温计[欧姆龙（大连）有限公司]。

2 方法

2.1 三臣小儿退热贴膏的制备

药物处方药为等比例的红花、人工牛黄、天竺黄，基质处方为聚丙烯酸钠、甘羟铝、酒石酸、氮酮、甘油、水、药粉（6∶0.20∶0.15∶2∶30∶48∶10）。

制备方法如下：取处方量红花，加入 15 倍量 60%乙醇，浸泡提取 3 次，60 min/次，合并提取液；回收乙醇，50 ℃减压浓缩成浸膏，备用。人工牛黄和天竺黄粉碎至过 150 目筛，备用。将聚丙烯酸钠和甘羟铝加入盛有甘油的烧杯中，充分搅匀后加入处方量人工牛黄、天竺黄药粉和氮酮，用搅拌器混合均匀作为 A 相；酒石酸溶于纯化水，加入红花提取浸膏后用搅拌器搅拌均匀作为 B 相；将 B 相缓慢加入 A 相中，搅拌至充分交联后，涂布于无纺布上，盖上保护膜，室温下放置干燥。同法制备空白基质贴膏。

2.2 分组、造模与给药

大鼠于实验环境中每日测量肛温 2 次，使其适应 3 d，实验前 12 h 禁食不禁水，用电动剃毛器为大鼠腹部相应部位剃毛，以 8%硫化钠脱毛，脱毛面积为 5 cm×5 cm。实验当日每小时测量体温 1 次，连续 3 次，3 次体温的平均值作为基础体温，剔除 1 次体温＞38 ℃及温度变化＞0.3 ℃的大鼠[12]。

将符合要求的大鼠按基础体温随机分为对照组、模型组、阿司匹林（100 mg/kg）组以及三臣小儿退热贴膏高、中、低剂量（16、8、4 mg/kg，以羟基红花色素含量计）组和空白基质贴膏组，每组 8 只。模型组和各给药组大鼠背部 sc 酵母（10 mL/kg）[13]，对照组背部 sc 等体积氯化钠注射液。造模后第 4 小时，阿司匹林组 ig 药物，三臣小儿退热贴膏组和空白基质膏组腹部脱毛部位分别贴相应贴膏，用实验用大鼠贴剂固定带加以固定。造模第 7 小时，各给药组再给予相应的受试药物。从造模开始，每小时测量肛温 1 次，连续 10 次。

2.3 样品的采集与制备

最后 1 次测完体温后，大鼠 ip 3%戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉采血，取血后大鼠脱颈椎处死。对照组、模型组和三臣小儿退热贴膏高剂量组取血于肝素钠管中，3000 r/min 离心 10 min，取上清液，于 −80 ℃保存，用于后续超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱（UPLC-QE-MS）分析。

取 50 μL 样品，加入 200 μL 含同位素标记内标混合物的提取液[甲醇-乙腈（1∶1）]，涡旋混匀 30 s，于冰水浴超声 10 min，−40 ℃静置 1 h，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液上机检测。所有样品另取等量上清液混合成质控样品上机检测[14]。

2.4 色谱和质谱条件

2.4.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水的水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0～0.5 min，95% B；0.5～7.0 min，95%～65% B；7.0～8.0 min，65%～40% B；8.0～9.0 min，40% B；9.0～9.1 min，40%～95% B；9.1～12.0 min，95% B；体积流量为 0.5 mL/min；柱温为 30 ℃；样品盘温度为 4 ℃；进样体积为 2 μL。

2.4.2 质谱条件 鞘气流量体积为 30 arb；辅助气流量体积为 25 arb；毛细管温度为 350 ℃；全质谱分辨率为 60 000；MS/MS 分辨率为 7500；碰撞能量为 10、30、60 eV；喷雾电压为 3.6 kV/−3.2 kV；扫描范围 *m*/*z* 70～1050。

2.5 数据处理与统计学分析

2.5.1 体温反应曲线的绘制 计算各组大鼠体温变化，以时间为横坐标、体温变化为纵坐标，绘制体温反应曲线。

体温变化＝测得体温－基础体温

2.5.2 体温反应指数的计算 纵坐标按 0.4 ℃对应 1 cm，横坐标按 1 h 对应 l cm 的比例，计算造模后

4～10 h 体温反应曲线与基线之间的面积，共计 5 个梯形的面积，数值越低，表明解热效果越好。

2.5.3 代谢组学数据处理　质谱仪采集的数据为“raw”格式，通过格式转换软件 MSconvert 将原始数据转化成“mzXML”格式，将数据进行 R 语言 xc-ms 软件包预处理[15-16]，包括峰匹配、峰对齐、滤噪、保留时间校正，最终获得 1 个三维数据矩阵（含保留时间、峰强度、质荷比信息），将三维矩阵信息以“csv”格式导入在线数据分析软件，导入 SIMCA-P13.0 进行多元统计分析，包括无监督的主成分分析（principal component analysis，PCA）[17]和有监督的正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）[18]，筛选出投影变量重要性（variable importance in projection，VIP）＞1 的变量，将其以“xls”格式导入 MassProfiler Professional 软件中分析，筛选 P＜0.01 的变量，作为生物标志物。根据获得的潜在标志物的精确相对分子质量检索 HMDB、METLIN、京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）和 MetaboAnalyst 3.0 等数据库[19-20]，参考相关文献及质谱信息鉴定生物标志物，通过比对一级质谱信息得到的精确相对分子质量并结合结构碎片信息，通过查找文献与在线数据库比对，对筛选出来的差异化学成分进行鉴定和通路分析。

2.5.4 统计学分析　数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件分析，两组间差异比较采用独立样本 t 检验，多组间差异比较采用单因素方差分析。

3　结果

3.1　三臣小儿退热贴膏对干酵母致发热大鼠体温的影响

如表 1 和图 1 所示，与对照组比较，造模后 4 h 模型组大鼠体温显著升高（P＜0.01），表明造模成功。造模后 4 h 各给药组给予受试药物，如表 2 所示，与模型组比较，各给药组大鼠体温反应指数显著降低（P＜0.01）；与阿司匹林组比较，三臣小儿退热贴膏低剂量组和空白基质贴膏组体温反应指数显著升高（P＜0.05）；与空白基质贴膏组比较，

表 1　各组大鼠造模后各时间点的体温（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

Table 1　Body temperature of rats in each group at various time point after modeling（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	体温/℃						
		造模后 4 h	造模后 5 h	造模后 6 h	造模后 7 h	造模后 8 h	造模后 9 h	造模后 10 h
对照	—	0.09±0.15	0.03±0.14	0.09±0.15	0.10±0.17	0.06±0.14	0.08±0.08	0.04±0.12
模型	—	0.81±0.15**	1.10±0.12**	1.60±0.17**	1.82±0.19**	1.63±0.18**	1.55±0.14**	1.41±0.15**
阿司匹林	100	0.83±0.14	0.99±0.13	0.69±0.15$^{\#\#}$	0.65±0.09$^{\#\#}$	0.34±0.11$^{\#\#}$	0.20±0.13$^{\#\#}$	0.13±0.10$^{\#\#}$
三臣小儿退热贴膏	16	0.84±0.01	0.83±0.12$^{\#\#\triangle}$	0.88±0.17$^{\#\#\triangle}$	0.68±0.15$^{\#\#}$	0.55±0.13$^{\#\#\triangle}$	0.38±0.14$^{\#\#\triangle}$	0.26±0.05$^{\#\#\triangle}$
	8	0.84±0.17	0.85±0.13$^{\#\#}$	0.90±0.12$^{\#\#\triangle}$	0.83±0.10$^{\#\#\triangle}$	0.71±0.15$^{\#\#\triangle}$	0.58±0.11$^{\#\#\triangle}$	0.41±0.11$^{\#\#\triangle}$
	4	0.83±0.16	0.88±0.13$^{\#\#}$	1.05±0.07$^{\#\#\triangle}$	1.10±0.14$^{\#\#\triangle}$	0.90±0.12$^{\#\#\triangle}$	0.86±0.14$^{\#\#\triangle}$	0.83±0.12$^{\#\#\triangle}$
空白基质贴膏	—	0.81±0.13	0.80±0.12$^{\#\#\triangle}$	1.02±0.13$^{\#\#\triangle}$	1.20±0.12$^{\#\#\triangle}$	0.80±0.13$^{\#\#\triangle}$	1.01±0.08$^{\#\#\triangle}$	0.65±0.05$^{\#\#\triangle}$

与对照组比较：$^{**}P$＜0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$＜0.01；与阿司匹林组比较：$^{\triangle}P$＜0.05

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

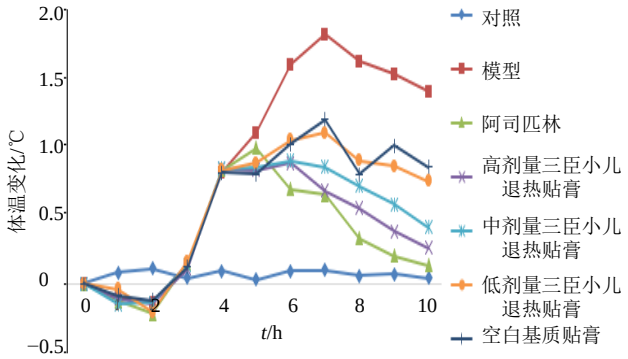

图 1　各组大鼠的体温反应曲线（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

Fig. 1　Body temperature response curve of rats in each group（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

表 2　各组大鼠造模后 4～10 h 的体温反应指数

Table 2　Body temperature response index of rats in each group of 4—10 h after modeling

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	体温反应指数/cm^2
对照	—	0.415
模型	—	8.775**
阿司匹林	100	3.340$^{\#\#\blacksquare}$
三臣小儿退热贴膏	16	3.870$^{\#\#\blacksquare\blacksquare}$
	8	4.515$^{\#\#\blacksquare}$
	4	5.620$^{\#\#\triangle}$
空白基质贴膏	—	5.660$^{\#\#\triangle}$

与对照组比较：$^{**}P$＜0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$＜0.01；与阿司匹林组比较：$^{\triangle}P$＜0.05；与空白基质贴膏组比较：$^{\blacksquare}P$＜0.05 $^{\blacksquare\blacksquare}P$＜0.01

$^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group; $^{\triangle}P$ < 0.05 *vs* aspirin group; $^{\blacksquare}P$ < 0.05　$^{\blacksquare\blacksquare}P$ < 0.01 *vs* blank matrix plaster group

三臣小儿退热贴膏中、高剂量组和阿司匹林组大鼠体温反应指数显著降低（P＜0.05、0.01），表明三臣小儿退热贴膏能够降低干酵母致发热大鼠的体温，且呈剂量相关性，其中高剂量三臣小儿退热贴膏作用最强，退热作用平稳；空白基质贴膏也有一定的物理降温作用，但是其解热作用不持久且不稳定。

3.2 多元统计分析

3.2.1 血浆代谢轮廓分析 通过 UPLC-QE-Exactive 分析各组大鼠血浆代谢物，如图 2 所示，正、负离子模式下，各组大鼠血浆代谢物总离子流图峰高与保留时间有一定差异，表明各组大鼠代谢模式存在差异。

3.2.2 质谱模式分析 将获得的检测数据矩阵进行数据预处理和 PCA 分析，如图 3-A 所示，正、负离子模式下，质控样本明显聚集在一起，且集中分布于 95%可信区间内，表明仪器和数据质量可靠。为观察各组的分组聚类效果，将标准化后的数据进行 PCA 分析，再做有监督的 OPLS-DA 模式识别，得到 OPLS-DA 二维得分图（图 3-B、C），对照组与模型组、模型组与高剂量三臣小儿退热贴膏组样本明显分开，表明样本呈现出良好的分类效果。

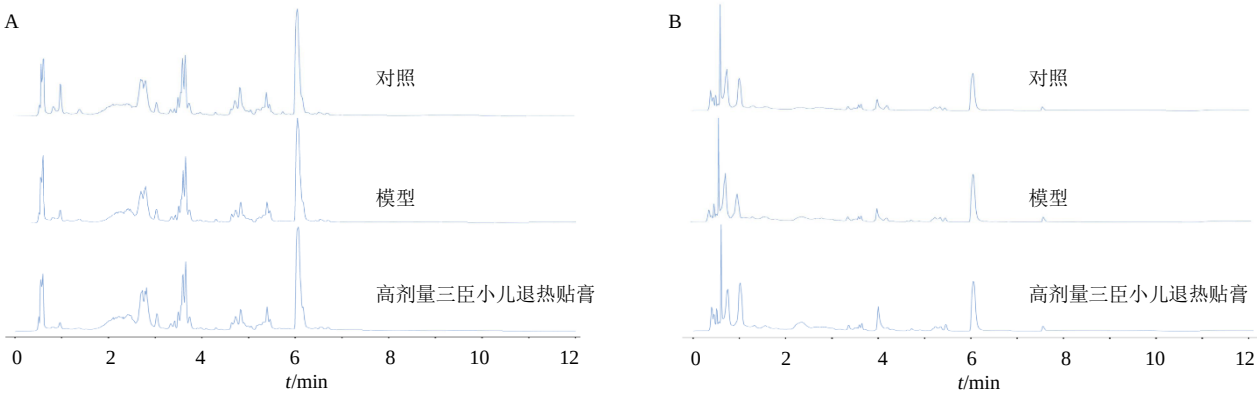

图 2 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下各组大鼠血浆总离子流图

Fig. 2 Total ion flow map of plasma of rats in each group in positive (A) and negative ion mode (B)

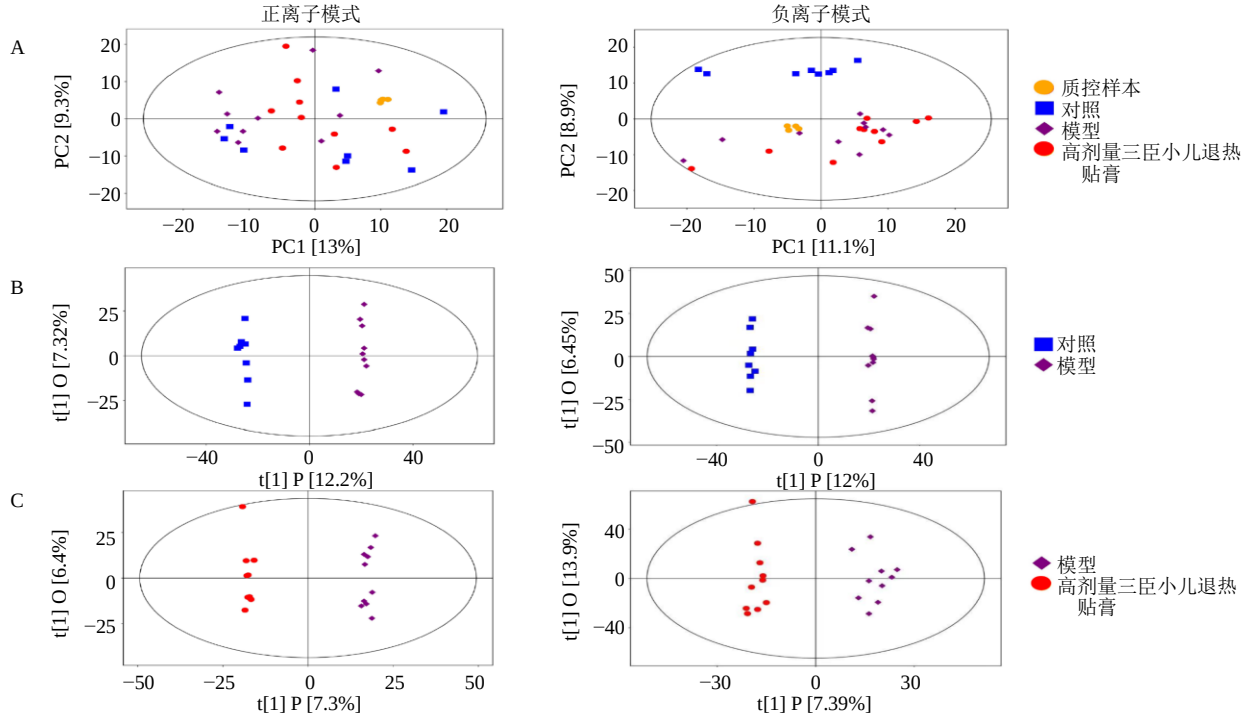

图 3 正、负离子模式下各组大鼠血浆样本的 PCA (A) 和 OPLS-DA (B、C) 散点图

Fig. 3 PCA (A) and OPLS-DA (B, C) scatter plot of plasma sample in rats in positive and negative ion mode

3.2.3　与发热相关的生物标志物指认　挑选 OPLS-DA 模块下 VIP＞1 的数据，通过 MassProfiler Professional 软件的 *t* 检验，以 *P*＜0.05 为条件筛选潜在代谢标志物，进行下一步标志物鉴定。通过 HMDB 数据库搜索，如表 3 所示，与对照组比较，模型组大鼠血浆中共发现 7 个具有统计学意义的代谢标志物，分别为酮亮氨酸、鞘磷脂[d17∶1/24∶1 (15*Z*)]、鞘磷脂[d18∶1/24∶1 (15*Z*)]、鞘磷脂[d18∶1/18∶1 (9*Z*)]、磷脂酰胆碱（16∶0/14∶0）、磷脂酰胆碱（18∶0/15∶0）、磷脂酰胆碱（16∶0/16∶0），其含量均显著上调（*P*＜0.05、0.01）。

3.2.4　三臣小儿退热贴膏对潜在生物标志物的回调作用　进一步分析三臣小儿退热贴膏组与模型组大鼠血浆中潜在生物标志物的差异，发现三臣小儿退热贴膏能够回调酮亮氨酸、鞘磷脂[d18∶1/24∶1 (15*Z*)]、磷脂酰胆碱（16∶0/16∶0）等潜在生物标志物的含量。此外，三臣小儿退热贴膏能够上调牛磺酸和异柠檬酸含量，表明三臣小儿退热贴膏能够通过回调 7 种生物标志物，并上调牛磺酸和异柠檬酸含量，从而发挥解热、抗炎的作用。

3.2.5　代谢途径分析　利用 HMDB 和 KEGG 数据库对筛选出来的模型组和三臣小儿退热贴膏组大鼠血浆中的差异化学成分进行通路分析。如图 4 所示，所筛选出的差异化学成分涉及牛磺酸和亚牛磺酸代谢、乙醛酸和二元酸代谢、柠檬酸循环、初级胆汁酸生物合成、烟酸和烟酰胺代谢、鞘脂代谢以及缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢等通路，表明三臣小儿退热贴膏通过调控以上代谢通路发挥退热作用。

4　讨论

目前市场上出现多种解热贴产品，但均利用凝胶的物理降温作用实现解热作用。本研究制备的蒙药三臣小儿退热贴膏具有中药退热、物理降温的双

表 3　各组大鼠血浆代谢生物标志物的相对含量（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

Table 3　Relative content of metabolic biomarkers in plasma of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

差异代谢物	相对含量		
	对照	模型	高剂量三臣小儿退热贴膏
牛磺酸	43.92±7.79	48.60±6.75	54.55±6.75$^{\#}$
异柠檬酸	2.99±0.75	2.62±0.26	4.02±0.86$^{\#\#}$
酮亮氨酸	4.63±0.98	15.37±13.67*	4.66±1.09$^{\#}$
磷脂酰胆碱（16∶0/16∶0）	20.76±1.51	29.47±2.46**	25.84±1.97$^{\#\#}$
磷脂酰胆碱（18∶0/15∶0）	0.59±0.09	0.77±0.16*	0.66±0.09$^{\#}$
磷脂酰胆碱（16∶0/14∶0）	1.74±0.33	2.41±0.29**	2.06±0.17$^{\#\#}$
鞘磷脂[d18∶1/18∶1 (9*Z*)]	0.83±0.12	1.51±0.18**	1.39±0.17$^{\#}$
鞘磷脂[d18∶1/24∶1 (15*Z*)]	12.08±1.63	13.99±1.55*	12.36±1.78$^{\#}$
鞘磷脂[d17∶1/24∶1 (15*Z*)]	1.00±0.07	1.23±0.05**	1.14±0.09$^{\#\#}$

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

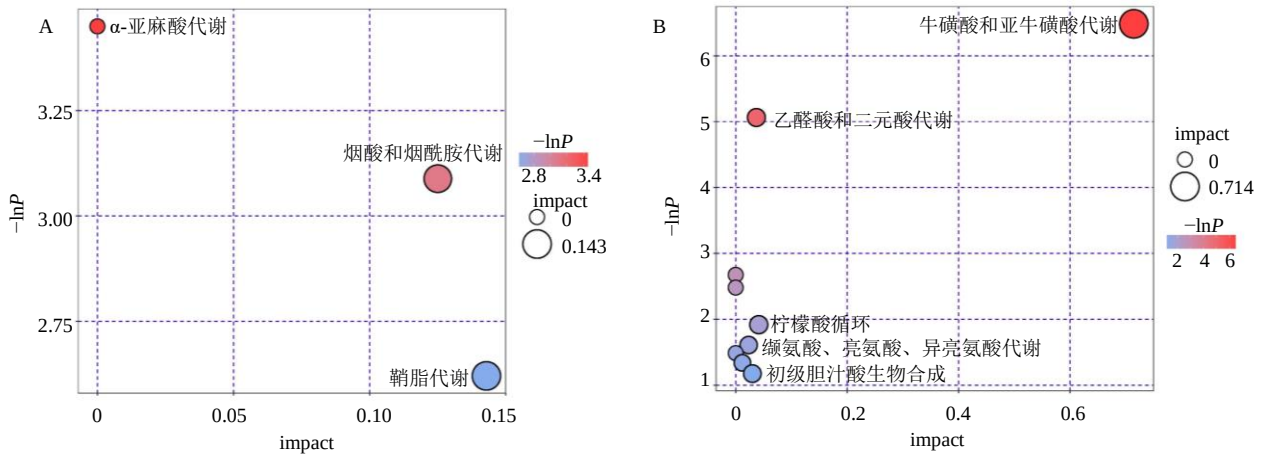

图 4　正离子 (A)、负离子 (B) 模式下三臣小儿退热贴膏组与模型组血浆差异化学成分的代谢通路分析

Fig. 4　Analysis of metabolic pathway of differential chemical composition in plasma between Sanchen Xiaoer Antipyretic Plaster and model group in positive (A) and negative (B) ion mode

重解热作用。基质中的凝胶能够通过蒸发凝胶中水分，带走皮肤表面的热量从而发挥物理降温作用；而蒙药三臣丸经皮吸收后，能够调节体内的多条能量代谢通路从而实现降温退热作用。结果显示，三臣小儿退热贴膏对干酵母致发热大鼠模型具有显著的解热功效，且呈剂量相关性，其中高、中剂量组疗效最佳。虽然阿司匹林退热效果确切且快速，但三臣小儿退热贴膏退热呈持久、平稳的趋势，更符合小儿用药，同时也符合蒙药多次反复给药的特征。

研究发现，干酵母致发热大鼠血浆中花生四烯酸、磷脂酰胆碱、琥珀酸、乳酸、3-呋喃甲酸、烟酸等多种代谢物水平上调[21]。本研究结果显示，与对照组比较，模型组大鼠血浆中共筛选出 7 种主要的潜在发热相关生物标志物，其中磷脂酰胆碱与以往报道相同，而酮氨酸、神经鞘脂是本研究中新发现的差异代谢物。经三臣小儿退热贴膏治疗后，7 种生物标志物含量均显著回调，同时血浆中牛磺酸和异柠檬酸含量升高，可协同发挥解热、抗炎作用。三臣小儿退热贴膏组方以人工牛黄为主药，主成分为牛磺酸[22]。牛磺酸能够抑制胆汁酸膜受体介导的大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 分泌肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6），从而发挥抗炎、免疫调节的作用[23]。柠檬酸是一种天然的抗氧化剂，能够抑制白细胞的髓过氧化物酶活性，发挥抗炎作用[24]。此外，模型组大鼠血浆中升高的 6 种代谢差异物均属脂肪类成分。研究表明，下丘脑对棕色脂肪组织的产热具有抑制作用[25]。但当致热原刺激下丘脑前部体温调节中枢神经元时，能够解除其对脂肪组织的抑制作用，加快脂肪分解产热，破坏机体产热散热动态平衡，导致机体异常发热[26]。三臣小儿退热贴膏能够降低血浆中脂类物质水平，提示其可通过影响脂肪酸分解供能，从而调节能量供应来发挥解热作用。代谢组学结果表明，三臣小儿退热贴膏对干酵母致发热大鼠的代谢紊乱也具有一定调节作用，其作用机制可能与酶抑制、氨基酸代谢、脂肪代谢、乙醛酸和二元酸代谢、柠檬酸循环、初级胆汁酸生物合成、α-亚麻酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、鞘脂代谢以及缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢等通路有关，具有靶点多态性，符合现代蒙药多成分、多靶点、多通路协同发挥作用的整体观点。本研究初步阐明蒙药三臣小儿退热贴膏的解热作用机制，为三臣小儿退热贴膏临床治疗小儿发热症提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 雷伟华, 刘丽萍, 刘自光. 发热研究进展 [J]. 中国保健, 2007, 15(15): 12-17.

[2] 宋洋洋, 任弋, 季晖, 等. 发热的分子机制研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(2): 99-103.

[3] 宇妥·元丹贡布. 四部医典 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2015: 297.

[4] 伊希巴拉珠尔. 甘露四部 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2015: 208-209.

[5] 胡燕芹, 袁发荣. 藏药安儿宁颗粒治疗小儿喉感冒 84 例的临床观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(4): 1-2.

[6] 索南昂秀. 藏药三臣颗粒治疗小儿发烧 50 例 [J]. 大家健康: 学术版, 2014, 8(20): 38.

[7] 郭洪耀, 林斌, 沙树奎. 番红花素促进烧伤大鼠的创面愈合与减轻疼痛 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 571-577.

[8] 李喜平, 张程亮, 刘东. 牛黄的现代研究 (四): 药理作用 [J]. 医药导报, 2017, 36(4): 355-360.

[9] 曹得萍, 白海燕, 赵海龙. 藏药中金属铜对继发性棘球蚴病小鼠体内细胞因子影响 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(3): 292-293.

[10] 中华人民共和国卫生部药品标准——蒙药分册 [S]. 1998: 56.

[11] 王东琴, 李晓伟, 张福生, 等. 基于 GC-MS 代谢组学技术的狭叶柴胡解热作用研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 574-580.

[12] 章烨雯. 小儿退热凝胶贴膏的制备工艺与评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[13] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, *et al*. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(7): 1060-1083.

[14] Wang J L, Zhang T, Shen X T, *et al*. Serum metabolomics for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma by UHPLC-QTOF/MS [J]. *Metabolomics*, 2016, 12(7): 1-10.

[15] Smith C A, Want E J, O'Maille G, *et al*. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(3): 779-787.

[16] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, *et al*. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(7): 1060-1083.

[17] Richards L E, Jolliffe I T. Principal component analysis [J]. *J Mark Res*, 1988, 25(4): 410.

[18] Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS) [J]. *J Chemom*, 2002, 16(3): 119-128.

[19] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.

[20] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, *et al*. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D457-D462.

[21] 郑蕊, 杜守颖, 郭瑞, 等. 基于代谢组学技术的清开灵软胶囊和硬胶囊解热作用差异性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 3979-3984.

[22] 巴根那. 蒙医方剂学 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2015: 269.

[23] 张子英. TCA 对 TGR5 介导的 NR8383 细胞 TNF-α 和 IL-1β 信号通路的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.

[24] 刘海玉. 基于代谢组学技术的清开灵注射液解热作用活性成分筛选及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[25] Cerri M, Morrison S F. Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus [J]. *Neuroscience*, 2006, 140(2): 711-721.

[26] Nakamura Y, Nakamura K, Morrison S F. Different populations of prostaglandin EP_3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions [J]. *Neuroscience*, 2009, 161(2): 614-620.

[责任编辑 李亚楠]