

基于粪便代谢组学的黄芩酒炙改善急性肺损伤的作用机制研究

孙豪杰, 王雅琪*, 胡婷婷, 万娜, 袁恩, 伍振峰, 杨明*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 基于粪便代谢组学技术考察生、酒黄芩对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 小鼠内源性代谢物的影响, 并探讨黄芩酒炙“行上焦、清湿热”的作用机制。方法 小鼠口服吸入脂多糖建立 ALI 模型, 通过脏器指数、肺组织病理及支气管肺泡灌洗液中细胞因子水平, 评价生、酒黄芩的疗效差异; 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS) 法检测内源性代谢物, 运用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 等方法寻找差异性代谢物及代谢通路。结果 与对照组比较, 模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数显著降低 ($P < 0.01$), 肺干湿质量比显著增加 ($P < 0.01$); 支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$)。酒黄芩组的免疫调节及炎症反应抑制作用均显著优于生黄芩组 ($P < 0.01$)。模型组小鼠粪便中氨基酸、脂质类代谢物均发生明显改变, 生黄芩通过影响 D-谷氨酰胺与 D-谷氨酸代谢通路、鞘脂类代谢通路抑制炎症反应, 酒黄芩通过影响苯丙氨酸代谢通路抑制炎症反应。结论 生、酒黄芩能够通过调节不同代谢通路抑制 ALI 小鼠肺部炎症反应, 为阐明黄芩生熟异用的作用机制差异提供思路。

关键词: 急性肺损伤; 黄芩; 酒炙; 粪便代谢组学; 内源性代谢物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5589-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.013

Mechanism of wine-processed *Scutellariae Radix* on acute lung injury based on fecal metabolomics

SUN Hao-jie, WANG Ya-qi, HU Ting-ting, WAN Na, YUAN En, WU Zhen-feng, YANG Ming

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of raw and wine-processed Huangqin (*Scutellariae Radix*) on endogenous metabolomics of mice with acute lung injury (ALI) through fecal metabolomics technology, and explore the mechanism of clearing upper-energizer dampness-heat of wine-processed *Scutellariae Radix*. **Methods** ALI mice model was established by lipopolysaccharide tracheal infusion, difference in therapeutic effect of raw and wine-processed *Scutellariae Radix* were evaluated by organ index, lung tissue pathology and cytokine levels in bronchial alveolar lavage fluid; UPLC-Q-TOF-MS was used to detect endogenous metabolites, principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and other metrological methods were used to find differential metabolites and metabolic pathways. **Results** Compared with control group, indexes of thymus and spleen in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), ratio of lung dry/wet weight was significantly increased ($P < 0.01$); Levels of interleukin-6 (IL-6), IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchial alveolar lavage fluid were significantly increased ($P < 0.01$), and IL-10 level was significantly decreased ($P < 0.01$). Immune regulation and inflammation inhibition effects of wine-processed *Scutellariae Radix* were significantly better than raw *Scutellariae Radix* ($P < 0.01$). Metabolism of amino acids and lipids in model group had significantly changed, raw *Scutellariae Radix* alleviated inflammation by regulating D-glutamine and D-glutamate metabolism pathways and sphingolipid metabolism, wine-processed *Scutellariae Radix* alleviated inflammation by regulating phenylalanine metabolism pathway. **Conclusion** Raw and wine-processed

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (GJJ201223); 湖南省重点研发计划项目 (2018SK2116)

作者简介: 孙豪杰 (1995—), 男, 硕士, 研究方向为中药质量分析与控制。

*通信作者: 王雅琪 (1988—), 副教授, 研究方向为中药质量分析与控制。Tel: (0791)87118108 E-mail: wangyaqi_3@163.com

杨明, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新工艺、新技术研究。Tel: (0791)87119032 E-mail: mingyang26@126.com

Scutellariae Radix alleviate pulmonary inflammation in ALI mice by regulating different metabolic pathways, which provide ideas for elucidating the wine-processed mechanism of *Scutellariae Radix*.

Key words: acute lung injury; *Scutellariae Radix*; wine-processed; fecal metabolomics; endogenous metabolomics

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]。《中国药典》2020 年版收载黄芩和酒黄芩 2 个品种: 生黄芩清热泻火, 解毒力强, 常须炮制后使用; 酒黄芩可借酒升腾之力, 用于治疗上焦肺热及四肢肌表之湿热^[2]。本课题组前期对黄芩炮制前后的化学成分进行分析, 发现黄芩酒炙后, 黄酮苷类成分含量下降, 黄酮苷元含量上升, 苷类成分与苷元的比例变化趋势明显, 可作为区分黄芩炮制前后的化学标志物^[3-6], 表明酒炙后黄芩药材发生化学成分等内在变化, 影响药物的性质及作用方向。目前针对黄芩酒炙对内源性成分、代谢通路等调控作用的研究较少, 开展关于黄芩酒炙升提清肺热的机制研究对阐述酒炙内涵具有重要意义。

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由多种肺内 (肺炎、感染等) 或肺外致病因素导致的急性弥漫性炎性肺损伤, 进而引起急性呼吸衰竭的临床综合征^[7-8]。全球急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的病死率高达 40% 以上, 为威胁人类健康的重要疾病。本研究对生、酒黄芩治疗脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 小鼠的药效作用差异及其粪便中差异性内源性代谢物进行研究, 阐明生、酒黄芩抑制肺部炎性反应潜在的生物标志物及相关代谢通路, 为酒炙黄芩“行上焦、清湿热”的作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 (20±2) g, 购自山东斯科贝斯生物科技股份有限公司, 动物许可证号 SCXK (鲁) 20160001。动物于相对湿度 (50±10) %、温度 (20±2) °C、自然节律光照的 SPF 级动物房适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 JZSYDWLL-20200611)。

1.2 药品与试剂

生黄芩饮片 (批号 18062101) 购自天津盛实百草药业有限公司, 经江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室杨明教授鉴定为唇形科植物黄芩

S. baicalensis Georgi 的干燥根, 酒黄芩饮片由生黄芩按《中国药典》标准规范炮制而成; LPS (批号 MB5198) 购自美国 Sigma 公司; 地塞米松磷酸钠注射液 (批号 1901082) 购自湖北天药药业有限公司; 小鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 2020-06R) 购自江苏酶免实业有限公司; 质谱级甲醇、乙腈购自上海罗恩公司; 色谱级甲酸购自德国 Merck 公司。

1.3 仪器

Triple TOF™ 5600 型液相色谱-串联质谱仪 (LC-MS, 美国 AB SCIEX 公司); Multiskan GO 1510 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BSA124 型万分之一电子分析天平、BT25S 型十万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); TGL-20MC 型台式高速冷冻离心机 (湖南湘鑫仪器仪表有限公司); KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); V3S025 型漩涡仪 (德国 IKA 公司); Medium-E400UF 型实验室纯水系统 (上海和泰仪器有限公司)。

2 方法

2.1 生、酒黄芩提取物的制备

称取生黄芩 50 g, 分别加入 10、8 倍量的水回流提取 2 h, 经纱布滤过, 合并 2 次滤液, 旋转蒸发浓缩至 50 mL, 得到含生药量 1 g/mL 的生黄芩提取物。酒黄芩按同法制得酒黄芩提取物。

2.2 分组、给药与造模

C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松 (5 mg/kg) 组、生黄芩 (15 g/kg) 组和酒黄芩 (15 g/kg) 组, 每组 8 只。生黄芩组和酒黄芩组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 7 d; 地塞米松组第 1~6 天 ig 等体积蒸馏水, 第 7 天 ip 地塞米松磷酸钠注射液。末次给药 30 min 后, 小鼠吸入异氟烷麻醉, 模型组和各给药组小鼠口咽后壁滴入 50 μ L LPS 溶液 (1 mg/mL), 对照组滴入生理盐水, 迅速捏住小鼠鼻孔, 维持 30 s, 等待出现轻微气管罗音, 即造模成功。造模 16 h 后, 于无菌条件下手持小鼠, 挤压小鼠肛门刺激排便, 用无菌冻存管收集, 于液氮中保存。

2.3 生、酒黄芩对 ALI 小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchial alveolar lavage fluid, BALF) 中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平的影响

小鼠吸入 CO₂ 安乐死, 行颈部手术暴露气管, 在甲状腺位置做 T 型切口, 用 22 G 静脉穿刺针做气管插管, 以 0.5 mL PBS 溶液灌洗左肺 3 次, 回抽灌洗液即得 BALF, 1500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 BALF 中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平。

2.4 生、酒黄芩对 ALI 小鼠肺干湿质量比和脏器指数的影响

取小鼠右肺下叶, 称定质量, 计算肺干湿质量比; 取胸腺、脾脏, 称定质量, 计算小鼠脏器指数。

肺干湿质量比 = 肺干质量 / 肺湿质量

脏器指数 = 脏器质量 / 小鼠体质量

2.5 生、酒黄芩对 ALI 小鼠肺组织病理变化的影响

取小鼠右肺上叶浸泡于组织固定液中, 室温放置 24 h 以上, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 粪便代谢组学研究

2.6.1 粪便样本处理 称取各组小鼠粪便样本 20 mg, 加入 120 μ L 甲醇, 匀浆 1 min, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 50 μ L, 进行超高效液相色谱-飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS) 分析。称取各粪便样本 10 mg, 按上述方法处理后作为质控样品。分析前连续进样 3 次确保仪器稳定性良好, 分析过程中每进 8 针样品后进 1 针质控样品。

2.6.2 色谱条件 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 3 mm, 2.6 μ m), 流动相为甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~4 min, 5%~25% B; 4~10 min, 25%~45% B; 10~22 min, 45%~95% B; 22~25 min, 95%~5% B; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 进样体积为 1 μ L。

2.6.3 质谱条件 离子化模式为电喷雾正离子模式和负离子模式; 离子源电压为 5500 V; 离子源温度为 550 $^{\circ}$ C; 去簇电压为 100 V/-100 V; 碰撞能量为 35 eV/-35 eV, 碰撞能量扩展为 20 eV; 雾化气体为 N₂; 辅助气 1 为 379.225 kPa, 辅助气 2 为 379.225 kPa, 气帘气为 241.325 kPa; 一级质谱母离子扫描范围为 m/z 50~1250; IDA 设置响应值超过 10 cp 的峰优先进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围为 m/z 50~1250, 开启动态背景扣除。

2.7 数据处理及分析

使用 Markview 1.3.1 软件对原始数据进行峰识别、对齐、滤噪、峰面积归一化等预处理, 得到含有代谢物保留时间 (t_R)、质荷比、强度等信息的数据矩阵文件。将其导入 SIMCA-P 14.0 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 将变量投影重要性值 (variable importance in projection, VIP) > 1.0 和 $P < 0.05$ 的变量视为差异变量。

利用 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库 (<http://www.kegg.ca/>) 对差异变量的二级碎片离子进行鉴定, 检索误差范围设置为 0.1; 使用 MetaboAnalyst 5.0 数据库 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 进行代谢通路分析, 影响值 > 0.1 的代谢通路被认为是潜在的靶点路径。

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析数据, 多组间两两比较采用 LSD- t 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8 软件绘制统计图。

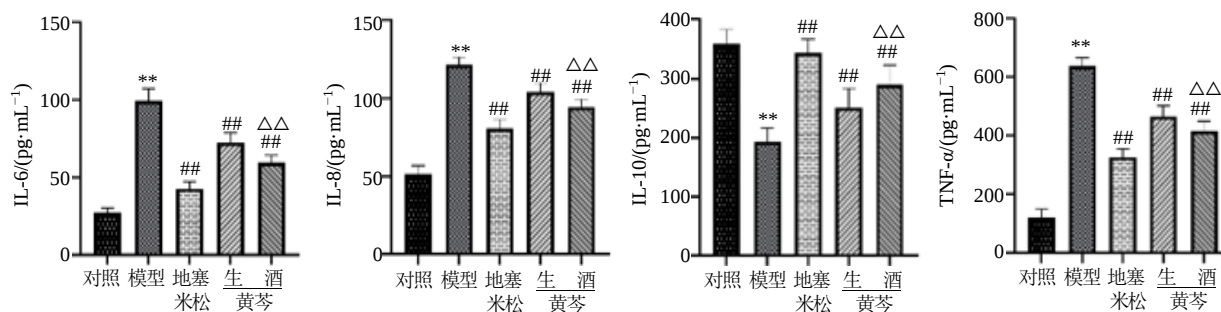
3 结果

3.1 生、酒黄芩对 ALI 小鼠 BALF 中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 生、酒黄芩组小鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著升高 ($P < 0.01$); 酒黄芩抑制 ALI 小鼠肺部炎症反应作用明显优于生黄芩 ($P < 0.01$)。

3.2 生、酒黄芩对 ALI 小鼠肺干湿质量比和脏器指数的影响

胸腺和脾脏指数通常被用作评估宿主免疫能力。如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠胸腺和脾脏指数均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 酒黄芩组小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 生黄芩组小鼠胸腺指数和脾脏指数呈升高趋势, 地塞米松组小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著降低 ($P < 0.01$), 表明地塞米松对机体免疫器官造成损伤^[9]。肺水肿是 ALI 最主要的病理特征之一, 与对照组比较, 模型组小鼠肺干湿质量比显著升高 ($P < 0.01$), 肺水肿严重; 与模型组比较, 地塞



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与生黄芩组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 图2、8同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs raw *Scutellariae Radix* group, same as fig. 2, 8

图1 生、酒黄芩对ALI小鼠BALF中IL-6、IL-8、IL-10和TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of raw and wine-processed *Scutellariae Radix* on levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in BALF of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

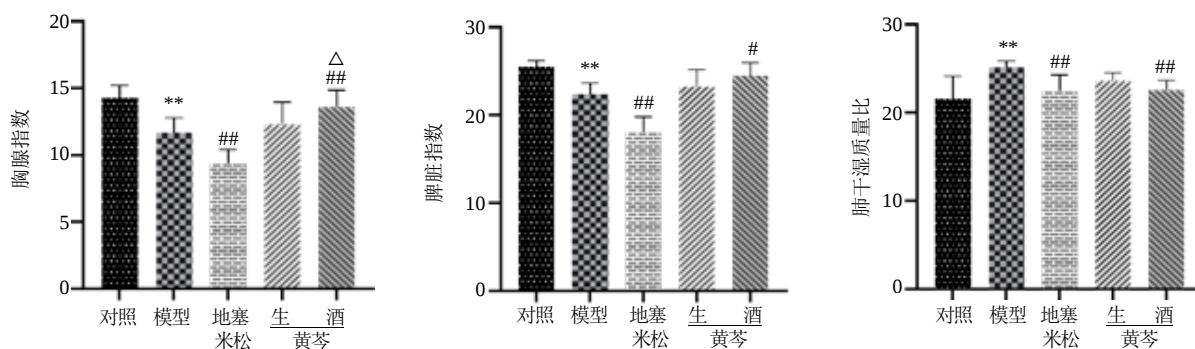


图2 生、酒黄芩对ALI小鼠胸腺指数、脾脏指数和肺干湿质量比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of raw and wine-processed *Scutellariae Radix* on thymus index, spleen index and lung dry-wet weight ratio in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

米松组和酒黄芩组小鼠肺干湿质量比显著降低 ($P < 0.01$), 生黄芩组小鼠肺干湿质量比呈降低趋势, 表明酒黄芩改善ALI小鼠脏器损伤的作用优于生黄芩。

3.3 生、酒黄芩对ALI小鼠肺组织病理变化的影响

如图3所示, 对照组小鼠肺组织结构清晰, 肺泡间隔及肺泡腔未见明显病理改变; 模型组小鼠肺组织炎性细胞浸润明显, 肺泡壁明显增厚和间质水肿, 表明造模成功; 各给药组肺组织病变程度降低, 炎性细胞浸润和红细胞渗出、增生等情况均有所改善, 其中酒黄芩组与对照组小鼠肺组织形态相似。

3.4 UPLC-QTOF-MS 分析

正、负离子模式下, 小鼠粪便总离子流图见图4。针对系统稳定性, 随机选取质控样本中的12个分子离子峰, 计算其 t_R 和峰强度的RSD见表1, 选取的12个分子离子峰 t_R 的RSD为0.02%~0.15%, 峰强度的RSD为3.14%~8.78%, 表明质控样品中的离子具有良好的质量准确度, 符合代谢组学分析要求。

3.5 多元统计分析

3.5.1 PCA 分析 如图5所示, 正、负离子模式下,

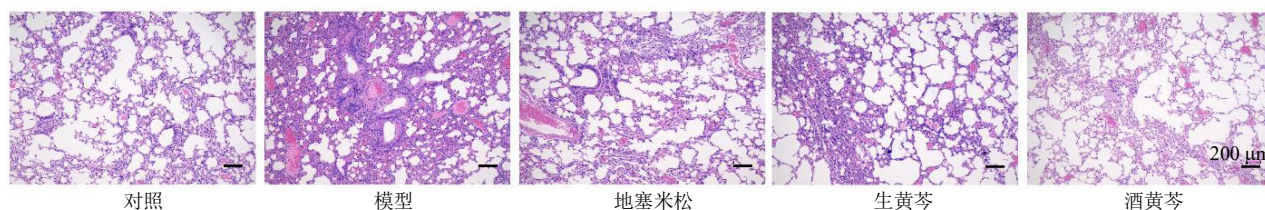


图3 生、酒黄芩对ALI小鼠肺组织病理变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of raw and wine-processed *Scutellariae Radix* on pathological changes of lung tissues in ALI mice (HE, $\times 100$)

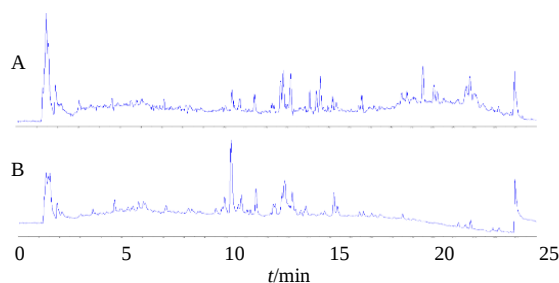


图 4 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下的小鼠粪便总离子流图
Fig. 4 Total ion chromatograms in fecal samples obtained in positive mode (A) and negative mode (B)

各组样本之间存在一定的交叉, 但对照组与模型组样本可较明显地分开, 表明 ALI 小鼠粪便中的代谢物发生了明显的变化。

3.5.2 OPLS-DA 分析 采用有监督的 OPLS-DA 方法确定 ALI 小鼠造模前后及生、酒黄芩治疗后粪便中内源性差异代谢物, 如图 6 所示, 对照组和模型组样本区分明显, 正离子模式: $R^2_X=0.451$, $R^2_Y=0.994$, $Q^2=0.869$; 负离子模式: $R^2_X=0.766$, $R^2_Y=1.000$, $Q^2=0.814$, 表明该模型具有较好的鲁棒性和预测能力。

表 1 系统稳定性验证

Table 1 System stability investigation

分子离子峰 (m/z)	t_R/min	t_R RSD/%	峰强度	峰强度 RSD/%
282.279 3	21.61 ± 0.00	0.02	$15\,560.71 \pm 489.29$	3.14
439.357 5	20.06 ± 0.03	0.13	$11\,096.99 \pm 682.11$	6.15
441.373 2	19.53 ± 0.01	0.04	$20\,802.46 \pm 1\,455.55$	7.00
149.022 7	18.63 ± 0.01	0.03	$53\,382.91 \pm 4\,170.04$	7.81
496.339 9	16.67 ± 0.01	0.03	$7\,954.20 \pm 263.75$	3.32
357.280 1	15.21 ± 0.01	0.04	$7\,708.21 \pm 331.99$	4.31
437.193 2	14.63 ± 0.01	0.05	$35\,310.97 \pm 1\,646.89$	4.66
255.065 8	12.82 ± 0.01	0.05	$33\,102.74 \pm 1\,840.95$	5.56
533.215 4	10.33 ± 0.01	0.14	$5\,346.38 \pm 366.32$	6.85
301.141 5	9.81 ± 0.01	0.12	$35\,561.05 \pm 3\,122.52$	8.78
467.215 6	7.14 ± 0.01	0.10	$8\,971.92 \pm 566.44$	6.31
549.160 8	5.79 ± 0.01	0.15	$6\,099.46 \pm 379.86$	6.23

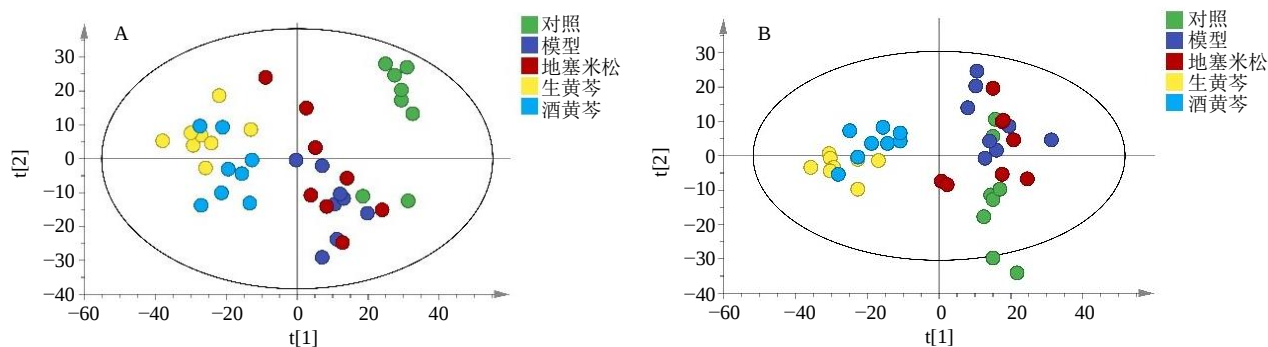


图 5 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下各组小鼠粪便样品的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plots of fecal samples of mice in different groups in positive mode (A) and negative mode (B)

3.6 ALI 小鼠粪便差异代谢物分析

基于上述 OPLS-DA 模型, 结合 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的筛选条件及数据库匹配结果, 最终在对照组与模型组小鼠粪便中鉴定出 10 个差异代谢物 (表 2)。与对照组比较, 模型组小鼠粪便中 *L*-蛋氨酸、孕酮、孕烯醇酮、*L*-谷氨酸、*L*-苯丙氨酸和鞘氨醇水平显著升高, 花生四烯酸、*L*-色氨酸、2'-脱氧尿苷和鸟苷水平显著降低。

影响 ALI 的代谢通路见图 7, 其中影响值 >0.1 的代谢通路有 9 条, 分别为: ①苯丙氨酸、酪氨酸与色氨酸的生物合成; ②*D*-谷氨酰胺与 *D*-谷氨酸代谢; ③苯丙氨酸代谢; ④花生四烯酸代谢; ⑤丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; ⑥鞘脂类代谢; ⑦色氨酸代谢; ⑧精氨酸的生物合成; ⑨半胱氨酸和蛋氨酸代谢。由此可见, ALI 小鼠体内正常的氨基酸代谢与脂质代谢水平发生紊乱。

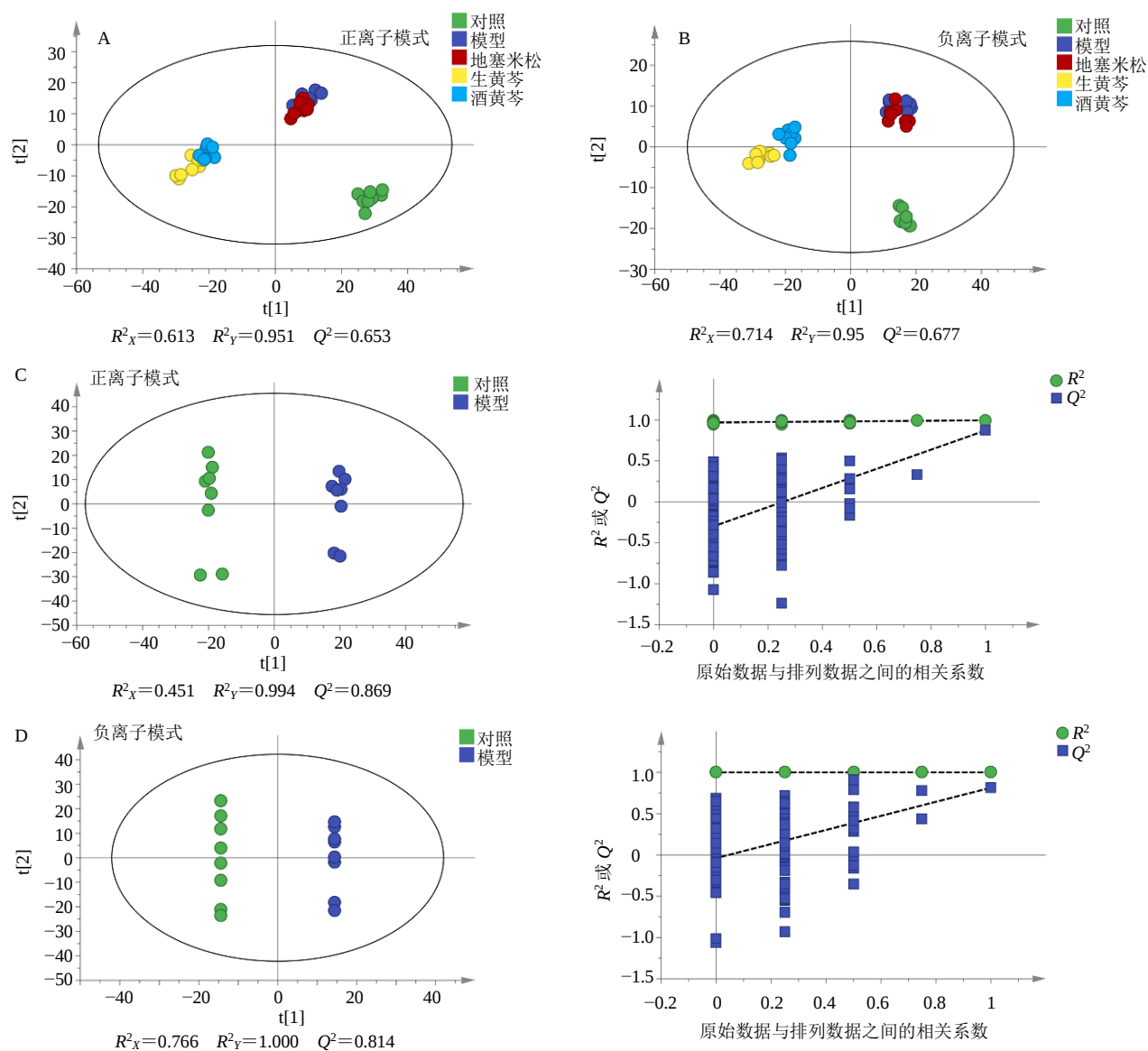


图6 正、负离子模式下小鼠粪便样品 OPLS-DA 得分图 (A、B) 及相应模型验证图 (C、D)

Fig. 6 OPLS-DA score plots (A, B) and corresponding model validation plot (C, D) of fecal samples in mice in positive and negative modes

表2 ALI 小鼠粪便内源性差异代谢物

Table 2 Different endogenous metabolites in fecal samples of ALI mice

序号	t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量		误差/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	名称	VIP	趋势
				理论值	测定值					
1	1.42	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	146.045 9	146.046 1	1.3	129.054 2, 85.028 5	L-谷氨酸	2.17	↑
2	1.88	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	150.058 3	150.058 1	-1.4	106.068 7, 77.037 8, 58.941 4, 54.031 8	L-蛋氨酸	1.73	↓
3	2.07	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	282.084 4	282.084 5	0.2	239.049 1, 196.050 8	鸟苷	1.96	↑
4	2.18	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	227.067 4	227.067 1	-0.9	184.094 6, 182.078 6, 166.050 4, 94.031 9	2'-脱氧尿苷	1.99	↑
5	3.05	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	164.071 7	164.071 8	0.8	147.045 3, 120.061 5, 103.055 1	L-苯丙氨酸	2.15	↑
6	3.90	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.082 6	203.082 5	-0.7	186.055 5, 159.039 2, 142.032 6	L-色氨酸	2.02	↑
7	13.79	$\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	302.305 4	302.305 6	0.7	267.095 1, 240.050 7, 169.191 5, 141.117 7	鞘氨醇	1.92	↓
8	16.61	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	317.247 5	317.247 4	-0.3	205.094 9, 173.055 4, 121.026 2	孕烯醇酮	1.33	↑
9	17.55	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	315.231 9	315.231 8	-0.3	279.266 0, 187.147 2, 137.133 0	孕酮	1.01	↓
10	21.55	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	305.247 5	305.247 6	0.2	245.173 2, 137.130 0, 57.058 4	花生四烯酸	1.27	↓

“↑”表示上升, “↓”表示下降

“↑” means up, “↓” means down

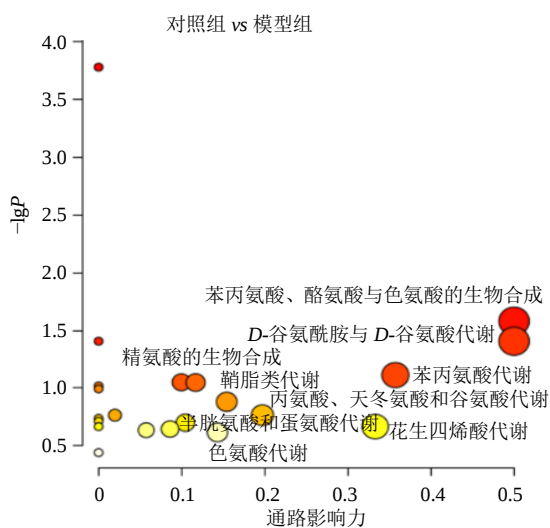


图 7 ALI 小鼠粪便代谢通路图

3.7 生、酒黄芩对 ALI 小鼠粪便中差异代谢物的影响

如图 8 所示, 与模型组比较, 生黄芩组小鼠粪便代谢物花生四烯酸、2'-脱氧尿苷、鸟苷和 *L*-色氨酸水平显著升高 ($P<0.01$), *L*-谷氨酸、*L*-苯丙氨酸、孕酮、孕烯醇酮和鞘氨醇水平显著降低 ($P<0.01$); 酒黄芩组小鼠粪便代谢物花生四烯酸、鸟苷和 *L*-色氨酸水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), *L*-谷氨酸、*L*-苯丙氨酸、孕酮、孕烯醇酮和鞘氨醇水平显著降低 ($P<0.01$); 生、酒黄芩组 *L*-蛋氨酸水平无明显变化。

生、酒黄芩干预 ALI 的粪便差异代谢物见表 3, 代谢通路见图 9, 生、酒黄芩通过调节不同代谢途径发挥作用。各组间小鼠粪便差异代谢物韦恩图见图 10, 对照组与模型组、模型组与生黄芩组重叠的

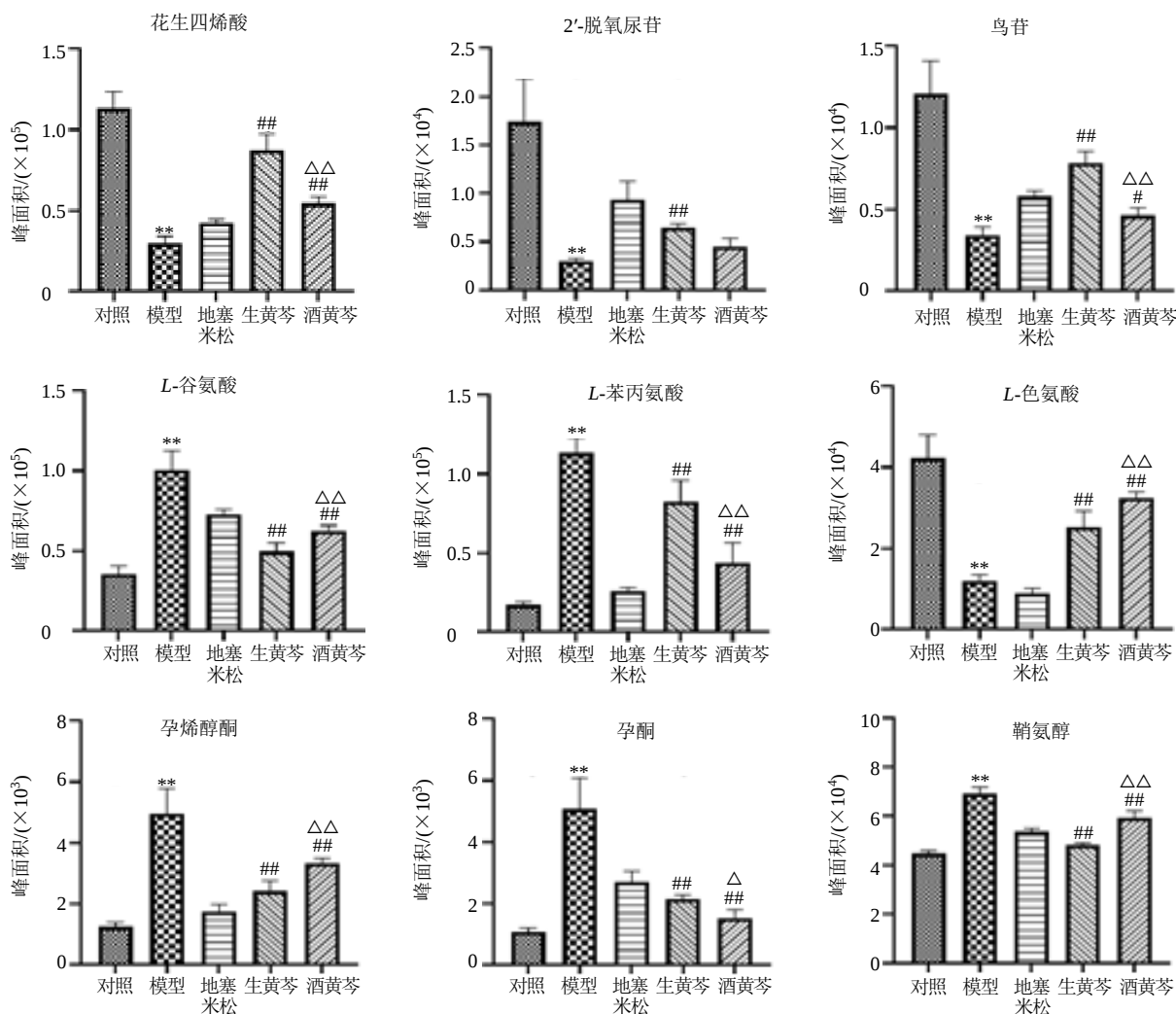


图 8 生、酒黄芩对 ALI 小鼠粪便中差异代谢物的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 8 Effect of raw and wine-processed *Scutellariae Radix* on differential metabolites in feces of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 3 生、酒黄芩干预 ALI 小鼠粪便内源性差异代谢物

Table 3 Different endogenous metabolites in feces of ALI mice intervened by raw and wine-processed *Scutellariae Radix*

序号	tr/min	分子式	离子模式	相对分子质量		误差/($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	名称
				理论值	测定值			
1	1.40	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	145.061 9	145.061 8	-0.5	128.047 9, 102.080 2	L-谷氨酰胺 ^a
2	1.40	C ₄ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	87.044 1	87.044 0	-0.7	69.060 0, 56.042 5	二乙酰 ^a
3	1.42	C ₅ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	130.04 99	130.049 8	-0.8	128.047 9, 102.080 2	L-焦谷氨酸
4	1.42	C ₅ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	146.045 9	146.046 1	1.3	129.054 2, 85.028 5	L-谷氨酸 ^a
5	1.43	C ₂ H ₇ NO ₃ S	[M+H] ⁺	126.021 9	126.022 0	0.5	108.952 6, 96.939 3	牛磺酸
6	1.45	C ₉ H ₉ N	[M+H] ⁺	132.076 8	132.076 7	-0.1	105.051 5, 103.054 3, 77.039 4	3-甲基吡啶
7	1.55	C ₅ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	129.019 3	129.019 3	-0.2	112.987 1, 85.029 2	柠檬酸
8	1.55	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	[M+H] ⁺	210.076 1	210.076 2	0.4	135.083 1, 109.073 1, 91.057 8, 65.038 6	羟基苯乙酰甘氨酸 ^a
9	1.89	C ₆ H ₅ NO ₂	[M+H] ⁺	124.039 3	124.039 2	-0.9	74.014 1, 54.033 2, 53.038 3, 51.023 7	2-吡啶甲酸
10	1.95	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M-H] ⁻	180.066 6	180.066 4	-1.0	136.076 3, 116.937 0, 92.922 6	L-酪氨酸
11	2.07	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻	282.084 4	282.084 5	0.2	239.049 1, 196.050 8	鸟苷
12	2.18	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	[M-H] ⁻	227.067 4	227.067 1	-0.9	184.094 6, 182.078 6, 166.050 4, 94.031 9	2'-脱氧尿苷
13	3.05	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M-H] ⁻	164.071 7	164.071 8	0.8	147.045 3, 120.061 5, 103.055 1	L-苯丙氨酸 ^b
14	3.28	C ₇ H ₇ NO ₃	[M+H] ⁺	154.049 9	154.049 7	-0.8	136.040 0, 108.045 5, 95.011 3, 78.034 6	3-羟基-2-氨基苯甲酸
15	3.90	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	203.082 6	203.082 5	-0.7	186.055 5, 159.039 2, 142.032 6	L-色氨酸
16	4.60	C ₅ H ₁₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	230.042 4	230.042 4	0.1	132.067 8, 114.053 0	5-磷酸核糖胺
17	6.03	C ₈ H ₈ O	[M+H] ⁺	121.064 8	121.064 7	-0.6	103.057 5, 77.039 6, 51.025 9	苯乙醛 ^b
18	9.60	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	[M-H] ⁻	514.284 4	514.285 0	1.2	496.271 1, 391.282 0	牛磺胆酸
19	12.89	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	[M+H] ⁺	425.341 4	425.341 4	0.1	271.213 9, 215.175 0, 163.111 2	α -生育三烯酚
20	13.79	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	[M+H] ⁺	302.305 4	302.305 6	0.7	267.095 1, 240.050 7, 169.191 5, 141.117 7	鞘氨醇 ^a
21	14.75	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	[M-H] ⁻	194.082 3	194.082 2	-0.5	177.022 5, 176.034 9, 150.056 3	多巴醌
22	16.61	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	317.247 5	317.247 4	-0.3	205.094 9, 173.055 4, 121.026 2	孕烯醇酮
23	17.55	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	315.231 9	315.231 8	-0.3	279.266 0, 187.147 2, 137.133 0	孕酮
24	20.59	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	277.217 3	277.217 0	-1.0	233.227 3, 59.013 8	α -亚麻酸
25	21.55	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	305.247 5	305.247 6	0.2	245.173 2, 137.130 0, 57.058 4	花生四烯酸
26	21.84	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	[M+H] ⁺	331.263 2	331.262 9	-0.7	257.102 5, 189.029 5, 175.090 2, 135.061 5	二十二碳五烯酸
27	22.86	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.233 0	255.232 7	-0.9	211.024 2, 156.479 6	棕榈酸

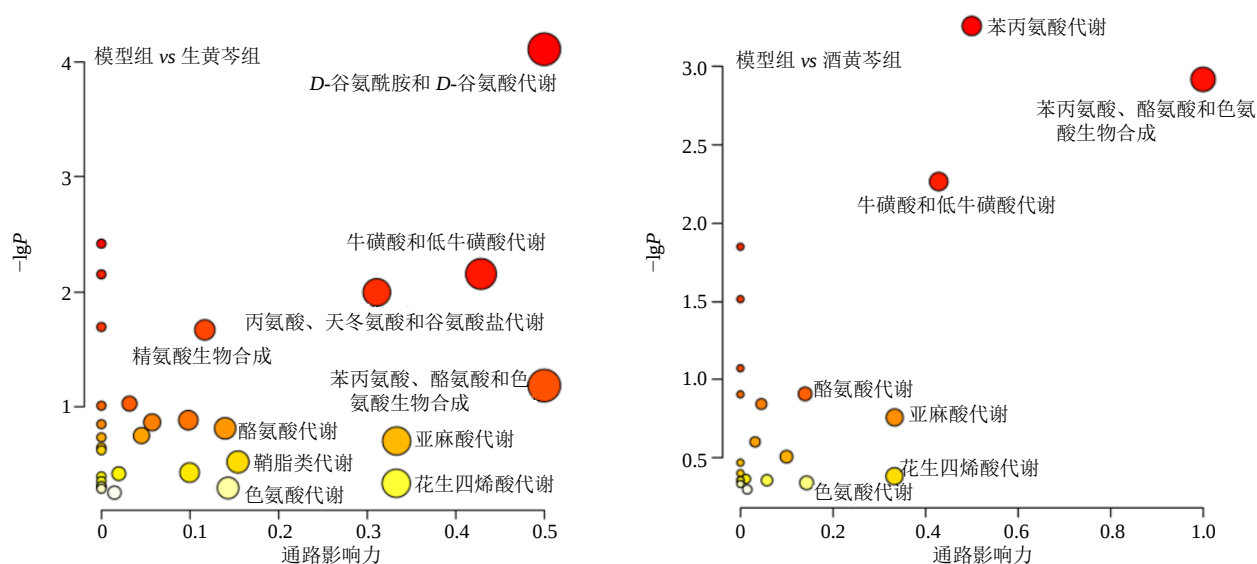
^a 模型组与生黄芩组共有; ^b 模型组与酒黄芩组共有; 未做标记为模型组、生黄芩组、酒黄芩组共有^a unique to model group and raw *Scutellariae Radix* group; ^b unique to model group and wine-processed *Scutellariae Radix* group; not marked as shared by model group, raw and wine-processed *Scutellariae Radix* group

图 9 生、酒黄芩干预后 ALI 小鼠粪便代谢通路图

Fig. 9 Fecal metabolism pathway in ALI mice intervened by raw and wine-processed *Scutellariae Radix*

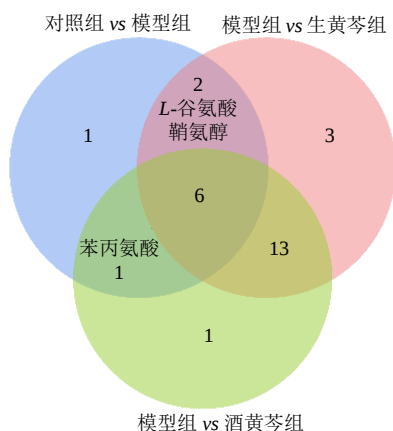


图 10 不同组间的粪便差异代谢物韦恩图

Fig. 10 Venn diagram of differential metabolites in feces between different groups

差异代谢物为鞘氨醇和 *L*-谷氨酸；对照组与模型组、模型组与酒黄芩组重叠的差异代谢物为 *L*-苯丙氨酸。生黄芩通过 *D*-谷氨酰胺与 *D*-谷氨酸代谢通路以及鞘脂类代谢通路缓解 ALI，而酒黄芩则调节苯丙氨酸代谢通路发挥疗效。

4 讨论

本研究通过小鼠口咽吸入 LPS 建立 ALI 模型，发现模型组小鼠出现免疫脏器损伤以及严重的肺组织损伤，且体内炎症因子水平失衡；酒黄芩的疗效优于生黄芩，与炮制理论一致。采用粪便代谢组学探究 ALI 潜在发病机制及黄芩酒炙干预 ALI 的内在机制，发现与对照组相比，ALI 小鼠粪便中鉴定得到 10 个差异代谢物，主要包括氨基酸类、鞘氨醇及花生四烯酸等，主要涉及多种氨基酸的合成与代谢以及脂质代谢，这些潜在的代谢通路文献报道一致^[10]。生黄芩组中鉴定得到 24 个差异代谢物，酒黄芩组中鉴定得到 21 个差异代谢物，结合通路富集分析和组间差异代谢物的并集分析，发现生黄芩通过调节 *D*-谷氨酰胺与 *D*-谷氨酸代谢通路和鞘脂类代谢通路发挥作用，而酒黄芩通过苯丙氨酸代谢通路发挥作用。

D-谷氨酰胺与 *D*-谷氨酸代谢通路中主要的代谢物 *L*-谷氨酸和 *L*-谷氨酰胺在抗氧化中发挥着重要作用^[11-12]。活性氧自由基的过量产生可引起 ALI^[13]，因此当与抗氧化剂相关的代谢通路激活时，生成抗氧化剂清除过量氧自由基，恢复免疫系统的正常运行，维持机体氧化还原平衡。谷氨酸受体重要亚型之一的 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体可因肺内谷氨酸含量升高

而过度激活，使肺组织出现高通透性肺水肿^[14]。本研究检测到模型组小鼠粪便中谷氨酸水平显著升高，表明 LPS 刺激后谷氨酸释放增多；在生黄芩干预下，谷氨酸水平显著下调，提示生黄芩可能通过阻断谷氨酸 NMDA 受体，发挥维持谷氨酸稳态与抗氧化应激的作用。近年来，大量研究表明苯丙氨酸在急性炎症性疾病中发挥作用。体内高浓度苯丙氨酸可能增加 ARDS 的死亡率^[15]。严重的肺部炎症反应导致苯丙氨酸-4-羟化酶及 5,6,7,8-四氢生物蝶呤活性降低，苯丙氨酸累积，从而促进炎症反应^[16]。本研究发现，给予酒黄芩后，ALI 小鼠粪便中苯丙氨酸向正常水平回调，提示酒黄芩具有促进其转化并抑制炎症反应的作用。

综上，本研究通过 ALI 模型模拟上焦湿热症，考察生、酒黄芩干预 ALI 小鼠的药效差异以及内源性代谢物的差异影响，探讨黄芩酒炙“行上焦、清湿热”的作用机制，为解释中药炮制机制提供了一种新模式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feng Z, Zhou J, Shang X, et al. Comparative research on stability of baicalin and baicalein administrated in monomer and total flavonoid fraction form of *Radix Scutellariae* in biological fluids in vitro [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1177-1184.
- [2] Huang P, Tan S Z, Zhang Y X, et al. The effects of wine-processing on ascending and descending: The distribution of flavonoids in rat tissues after oral administration of crude and wine-processed *Radix Scutellariae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 649-664.
- [3] 胡恋琪, 熊优, 王雅琪, 等. 黄芩饮片加工工艺标准化的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3281-3286.
- [4] 熊优, 王雅琪, 曹丽娟, 等. 不同产地黄芩片、酒黄芩质量评价研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2127-2133.
- [5] 熊优, 王雅琪, 焦姣姣, 等. 黄芩酒炙过程中化学成分含量变化及其与药效的相关性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16): 1-6.
- [6] 胡恋琪, 孙豪杰, 熊优, 等. 基于“成分-靶点-代谢”预测分析黄芩酒炙前后质量标志物 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2618-2626.
- [7] Ding Z H, Zhong R X, Yang Y N, et al. Systems pharmacology reveals the mechanism of activity of Ge-Gen-Qin-Lian Decoction against LPS-induced acute lung injury: A novel strategy for exploring active

- components and effective mechanism of TCM formulae [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104759.
- [8] Domscheit H, Hegeman M A, Carvalho N, *et al*. Molecular dynamics of lipopolysaccharide-induced lung injury in rodents [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 36.
- [9] Cannizzo F T, Cucuzza L S, Divari S, *et al*. Gene expression profile associated with thymus regeneration in dexamethasone-treated beef cattle [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2018, 65: 101-108.
- [10] Wang T Y, Lin S, Liu R, *et al*. Metabolomic profile perturbations of serum, lung, bronchoalveolar lavage fluid, spleen and feces in LPS-induced acute lung injury rats based on HPLC-ESI-QTOF-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(5): 1215-1234.
- [11] Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, *et al*. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1564.
- [12] Kim M H, Kim H. The roles of glutamine in the intestine and its implication in intestinal diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1051.
- [13] Kellner M, Noonepalle S, Lu Q, *et al*. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 105-137.
- [14] 沈浩, 郑吉建, 徐子锋, 等. 氯胺酮预处理对谷氨酸诱发大鼠肺损伤的保护作用 [J]. *中国临床医学*, 2012, 19(1): 62-64.
- [15] Xu J, Pan T T, Qi X L, *et al*. Increased mortality of acute respiratory distress syndrome was associated with high levels of plasma phenylalanine [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 99.
- [16] Dong Y L, Bai Y P, Liu G H, *et al*. The immunologic and antioxidant effects of *L*-phenylalanine on the uterine implantation of mice embryos during early pregnancy [J]. *Histol Histopathol*, 2014, 29(10): 1335-1342.

[责任编辑 李亚楠]