

[21]

Liu G, Gu K, Wang F, *et al.* Tryptophan ameliorates barrier integrity and alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 through the CaSR/Rac1/PLC- γ 1 signaling pathway in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 748497.

[22]

Cheng H, Liu J, Zhang D, *et al.* Ginsenoside Rg1 alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 817600.

[23]

Scott S A, Fu J, Chang P V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function *via* the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117 (32): 19376-19387.

[24]

龙静怡, 梁爱华. 中药调控肠道菌群改善溃疡性结肠炎大肠湿热证的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(1):244-254.

[25]

Xu J, Chen N, Wu Z, *et al.* 5-Aminosalicilyc acid alters the gut bacterial microbiota in patients with ulcerative colitis [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1274.

[26]

李建军, 陈海泉. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群分布特征分析[J]. 河南医学研究, 2022, 31(19): 3497-3500.

[27]

李 琪, 孙 悦, 丁成华, 等. 泄泻湿证患者肠道菌群特征分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28 (1): 108-113.

[28]

岳 宏, 王天芳, 陈剑明, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 306-308.

[29]

张 杰, 李易易, 张兆辉. 溶血磷脂酸及其受体对中枢神经系统疾病影响的研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(1): 118-121; 126.

[30]

董 新, 张 梅. 苯唑西林钠碱性降解物的分析研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(12): 2429; 2431.

基于血清代谢组学探究平喘颗粒对支气管哮喘大鼠的影响

蒋鹏娜^{1,2}, 李竹英¹, 田春燕¹, 董文婷², 霍金海^{2*}
(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036)

摘要: **目的** 观察平喘颗粒对支气管哮喘大鼠血清代谢轮廓的影响。**方法** Wistar 大鼠随机分为空白组 (7 只) 和造模组 (21 只), 利用抗原致敏和 1% OVA 生理盐水溶液持续雾化激发 6 周建立哮喘模型, 将造模成功大鼠随机分为模型组、平喘颗粒组 (5.4 g/kg) 和地塞米松组 (1 mg/kg), 每组 7 只, 灌胃给药 1 个月, 期间观察大鼠行为学变化。给药结束后, 检测大鼠血清炎症因子 (IL-4、IL-13) 水平, 观察肺组织病理改变。收集血清, 采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术, 结合多元统计分析方法, 分析血清代谢谱的变化。**结果** 与模型组比较, 平喘颗粒可改善大鼠哮喘症状, 降低 IL-4、IL-13 水平 ($P<0.05$), 并能恢复肺组织炎性病理状态。在正负离子模式下, 共筛选出 21 个差异标志物, 包括磷脂类、胆汁酸类等, 平喘颗粒可明显回调其异常表达。**结论** 平喘颗粒有较强的修复肺组织的能力, 可通过恢复与细胞结构、功能密切相关的脂质代谢而起到平喘作用。

关键词: 平喘颗粒; 哮喘; 代谢组学; UPLC/Q-TOF-MS; 差异标志物; 磷脂; 胆汁酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)12-4196-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.048

支气管哮喘是一种气道慢性炎症性疾病, 目前全球约有 3 亿哮喘患者, 我国约占 6.67%, 据统计全球每年死于该病的患者约有 25 万人^[1]。哮喘属中医“哮证”范畴, “痰饮夙根”是其发病关键, 治疗应以“温阳益气、平喘化痰”为主。平喘颗粒来源于黑龙江中医药大学附属第一医院呼吸科临床常用经验方温阳平喘汤, 是临床运用近五

十年的有效制剂, 由淫羊藿、炙麻黄、黄芪、太子参、五味子、款冬花、地龙、罂粟壳、知母共 9 味药组成, 具有温阳益气、化痰平喘之功效, 用于治疗哮喘慢性持续期阳虚痰盛型, 亦可用于具有相同症候的其他咳嗽病, 具有较好的临床疗效^[2]。研究表明, 平喘颗粒具有较好的镇咳、祛痰、抗急、慢性炎症、抗疲劳、抗乏氧、提高免疫力、

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 国家自然科学基金 (82074365); 国家自然科学基金青年基金 (82104761); 黑龙江省博士后项目 (LBH-Z19100)

作者简介: 蒋鹏娜 (1981—), 女, 博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗呼吸疾病的研究。Tel: 13946050281, E-mail: jpengna301@126.com

* 通信作者: 霍金海 (1981—), 男, 博士, 研究员, 从事中药质量评价及药效物质基础研究。Tel: 15104596152, E-mail: jinhaihuo@126.com

平喘作用，能减轻哮喘后的炎症反应^[3-4]。

通过对生物体内在动态变化、代谢图谱的整体分析和相关参数定量测定的模式分析，以及代谢组学中对获得相对应的生物标记物群分析，可进一步揭示特定环境下生物体内源性小分子代谢产物的整体变化。本研究在既往对哮喘模型大鼠炎性及免疫调节的研究基础上^[5-6]，通过建立大鼠哮喘模型，给予平喘颗粒进行干预，并采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术和多元统计方法，进一步探讨喘颗粒治疗哮喘的生物学机制，以期和平喘颗粒的应用提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 平喘颗粒（规格 10 g/袋，批号 20150102）由黑龙江中医药大学附属第一医院制备，加生理盐水溶解，制成 0.54 g/mL 的溶液，备用。灭活百日咳杆菌疫苗（批号 20120222）购自北京生物制品研究所有限责任公司；地塞米松磷酸钠注射液（批号 20190605）购自福建省泉州海峡制药有限公司。鸡卵清蛋白（OVA）（批号 BC88709X，美国 Sigma 公司）。甲醇（分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；甲酸（色谱纯，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；蒸馏水（广州屈臣氏食品饮料有限公司）。

1.2 动物 28 只健康清洁级 Wistar 大鼠，雌雄各半，体重（200±20）g，饲养于黑龙江中医药大学药物安全性评价中心 [实验动物使用许可证号 SYXK（黑）2015-003]，温度（22±2）℃，相对湿度（50±10）%，雌雄分笼，自由饮食，观察大鼠在进食、饮水、二便、活动方面均无异常，适应性饲养 1 周后用于实验。

1.3 仪器 ACQUITY UPLC 配置二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器和柱温箱、Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）、AQUTY UPLC BEH C₁₈ VanGuard 预柱（2.1 mm×5 mm，1.7 μm）均购自美国 Waters 公司；Triple-TOFTM 5600+高分辨质谱仪（配置 ESI 源和 APCI 源）购自美国 AB Sciex 公司。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将 28 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后，随机分为空白组（7 只）和造模组（21 只），造模组大鼠采用 V 级 OVA 制备哮喘模型。造模过程分为致敏和激发 2 个阶段，致敏阶段分别于实验第 1、14、21 天用新鲜配制无菌生理盐水抗原液 1 mL 致敏（在大鼠四肢内侧给予每处皮下注射 0.2 mL，腹腔注射 0.2 mL），同时腹腔注射新鲜配制的百日咳杆菌菌苗注射液（含高温杀死的百日咳杆菌 6×10⁹/mL）1 mL。激发阶段于第 28~34 天将大鼠置于自制的密闭有机玻璃雾化箱内，用 402B 超声雾化器将含有 1% OVA 的生理盐水溶液持续雾化 30 min，每天 1 次，连续定时激发 5 d，然后每隔 1 d 激发 1 次，共激发 6 周。空白组用生理盐水代替进行致敏和激发。将造模后的大鼠随机分为模型组、平喘颗粒组和地塞米松组，于末次致敏后第 4 天开始灌胃给药，平喘颗粒给药剂量 5.4 g/kg，地塞米松给药剂量 1 mg/kg，空白组和模型组给予生理盐水

（1 mL/100 g）。激发阶段时，在激发前 1 h 完成药物灌胃。

2.2 大鼠一般状态观察 分别于造模、给药期间及给药后观察大鼠体质量变化、咳嗽等行为，以及毛发光泽度等。

2.3 样本采集

2.3.1 药效指标观察 各组大鼠禁食 12 h，并于末次激发 24 h 后，用 2% 戊巴比妥钠溶液（3.5 mL/kg）腹腔注射，待完全麻醉后，无菌条件下剪取右肺，经 PBS 冲洗后，将前叶置于 4% 多聚甲醛溶液中固定，制备组织切片，进行 HE 染色，观察肺组织病理变化。末次给药后禁食 12 h，腹主动脉采血于负压管中，4℃、3 000 r/min 离心 10 min，取血清用于代谢组学和炎症因子检测，按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-4、IL-13 水平。

2.3.2 血清代谢组学样品制备 取各组样本血清 200 μL，加入 800 μL 甲醇沉淀蛋白，涡旋 2 min，4℃、13 000 r/min 离心 10 min，取 80% 上清液用氮气吹干，加 200 μL 80% 甲醇复溶，4℃、13 000 r/min 离心 10 min，取上清液进样。

2.4 UPLC-Q-TOF 分析

2.4.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），AQUTY UPLC BEH C₁₈ VanGuard 预柱（2.1 mm×5 mm，1.7 μm）；流动相水（A）-乙腈（B），均含 0.1% 甲酸，梯度洗脱（0~4 min，5%~70% B；4~11 min，70%~85% B；11~12 min，85%~100% B；12~13 min，100% B；13~13.2 min，100%~5% B；13.2~15 min，5% B）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 30℃；进样量 5 μL。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源（ESI）；正、负离子扫描；离子源电压 5 500、-4 500 V；离子源温度 550℃；去簇电压 80、-80 V；碰撞能量 35、-35 eV；碰撞能量扩展 15、-15 eV；雾化气（N₂）压力 55 psi（1 psi = 6.895 kPa）；辅助气压力 55 psi；气帘气压力 35 psi。一级质谱母离子扫描范围 80~1 200 Da，子离子扫描范围 50~1 200 Da。

2.5 数据分析 将 UPLC/Q-TOF-MS 采集得到的数据导入 Waters Progenesis QI 软件进行峰匹配（Alignment）、峰提取（Peak Picking）、标准化（Normalization）、数据降维和质谱矩阵信息获取。再将数据导入 EZinfo 软件，对各组数据进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法-判别分析（OPLS/PLS-DA），选 VIP>1 和 P<0.05 的物质为差异性代谢物。将已鉴定的支气管哮喘生物标志物的英文名称、KEGG 或 HMDB 号导入代谢通路分析网站（<http://www.metaboanalyst.ca>）进行分析后，以 Impact>0 的标准筛选代谢途径，并绘制相应代谢通路图。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 软件进行处理，炎症因子的数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 空白组大鼠无明显异常表现；与空白组比较，模型组大鼠体质量减轻、皮毛失去光泽，呼

吸急促、严重者有点头呼吸和二便失禁情况；平喘颗粒组造模的前 4 周大鼠状态与模型组相当，应用平喘颗粒后症状逐渐减轻，但与空白组比较仍有明显的呼吸较快、间断咳嗽、皮毛略暗等情况。

3.2 平喘颗粒组对哮喘大鼠肺组织病理形态的影响 如图 1 所示，空白组肺泡轮廓及其腔体轮廓清晰，结构完整，肺泡壁呈单层上皮细胞，肺泡腔、肺泡壁整体结构完整，呈单层结构排列；模型组肺泡轮廓及其腔体结构破坏严重，

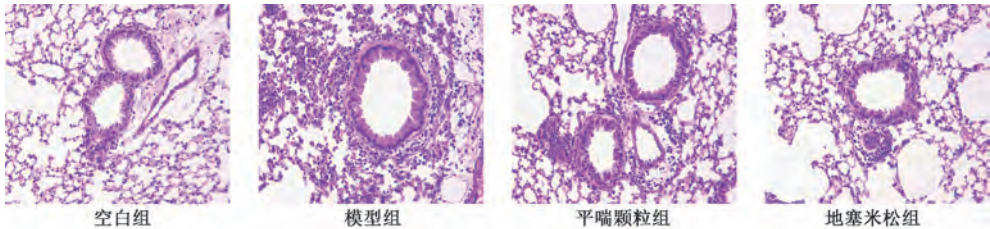
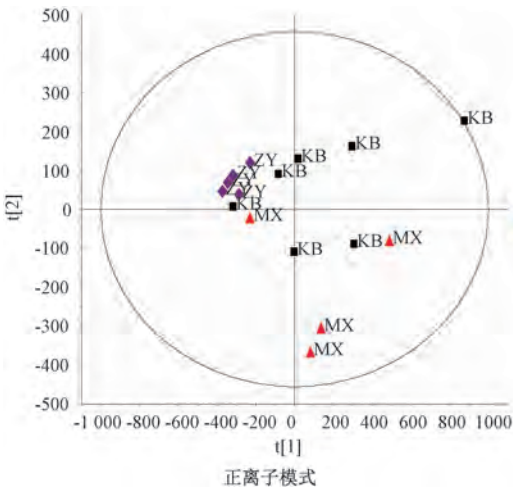


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色

3.3 平喘颗粒组对哮喘大鼠血清 IL-4、IL-13 水平的影响 与正常组比较，模型组 IL-4、IL-13 水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，平喘颗粒组和地塞米松组 IL-4、IL-13 水平降低 ($P<0.05$)，且平喘颗粒组 IL-4、IL-13 水平低于地塞米松组 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 IL-4、IL-13 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)		
组别	IL-4/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-13/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	16.33 $\pm$ 1.47	12.21 $\pm$ 1.57
模型组	33.67 $\pm$ 3.71 [#]	35.83 $\pm$ 3.73 [#]
地塞米松组	24.78 $\pm$ 3.07 [*]	21.20 $\pm$ 1.56 [*]
平喘颗粒组	21.89 $\pm$ 2.17 ^{*△}	18.92 $\pm$ 2.64 ^{*△}

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与地塞米松组比较，[△] $P<0.05$ 。



支气管及血管外周可见大量炎性细胞浸润，肺泡管、肺泡囊及肺泡壁轮廓模糊，结构消失；平喘颗粒组肺泡轮廓及其腔体结构较完整，支气管及血管外周可见中等量炎性细胞浸润，肺泡腔中可见少量尘细胞，组织中可见多个炎性细胞浸润灶；地塞米松组肺泡轮廓及其腔体清晰匀质，肺泡壁呈单层上皮细胞，肺泡腔、肺泡壁整体结构相对较完整，支气管及血管外周可见中等量炎性细胞浸润，肺泡腔中可见多个炎性细胞浸润灶。

3.4 血清代谢组学分析
3.4.1 PCA 分析 由图 3~4 可知，正负离子模式下，各给药组与空白组均聚类在同一区域，而模型组聚类在另一个区域，说明给药后能够回归模型组大鼠代谢轨迹的变化，提示平喘颗粒对哮喘大鼠具有一定干预作用。

3.4.2 血清潜在生物标志物的表征 通过对空白组、模型组进行 OPLS-DA 分析 (图 5)，以期通过代谢轮廓轨迹的变化，来生成相应的能直观反映贡献率得分图 (S-plot) 和 VIP>1 的得分图 (VIP-plot) (图 6)。从 S-plot 图中可以发现离子对代谢轮廓轨迹产生变化的贡献越大，其载荷图中距离原点越远，反之则越小。将变量重要投影值 (VIP>1)、 t 检验 ($P<0.05$) 的代谢物视为差异性代谢物，即在 S-plot 和 VIP-plot 图中被选中红色标记的离子。

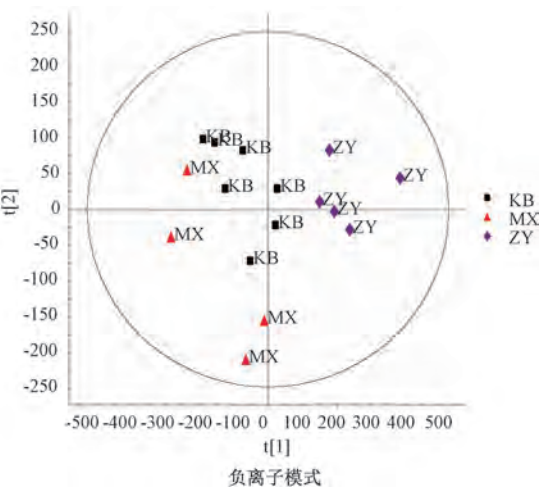
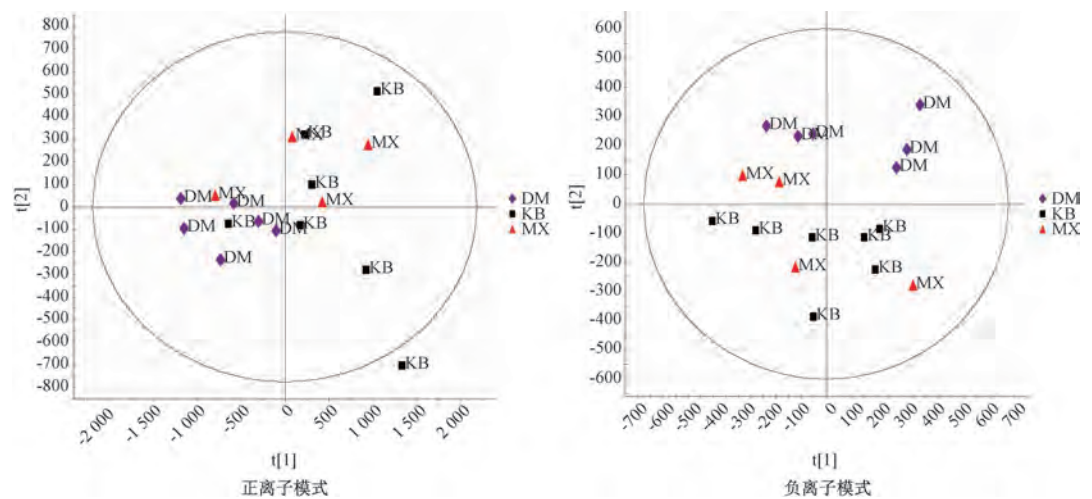


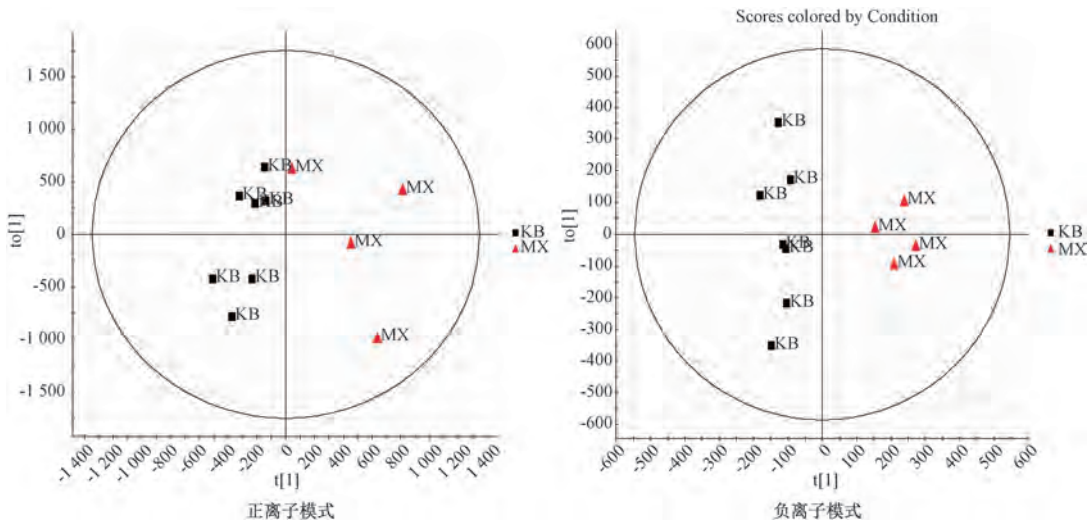
图 3 平喘颗粒组与空白组、模型组 PCA 模式识别分析 Scores plot 图

3.4.3 血清潜在生物标志物的鉴定 在“2.4”项条件下对上述得到的潜在生物标志物进行结构鉴定，结果见表 2。
3.4.4 生物标志物的代谢通路分析 将已鉴定的血液生物标志物的英文名称、KEGG 或 HMDB 号导入代谢通路分析

网站 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行分析后，以 Impact 大于 0 的通路为标准，得到与支气管哮喘密切相关的 6 个代谢通路，见图 7、表 3。由此可见，上述血液生物标志物在相应的代谢通路轨迹中，均发生了强烈的扰动和



注：DIM 为地塞米松组，KB 为空白组，MX 为模型组。
图 4 地塞米松组与空白组、模型组 PCA 模式识别分析 Scores plot 图



注：KB 为空白组，MX 为模型组。
图 5 空白组和模型组 OPLS-DA 分析 Scores plot 图

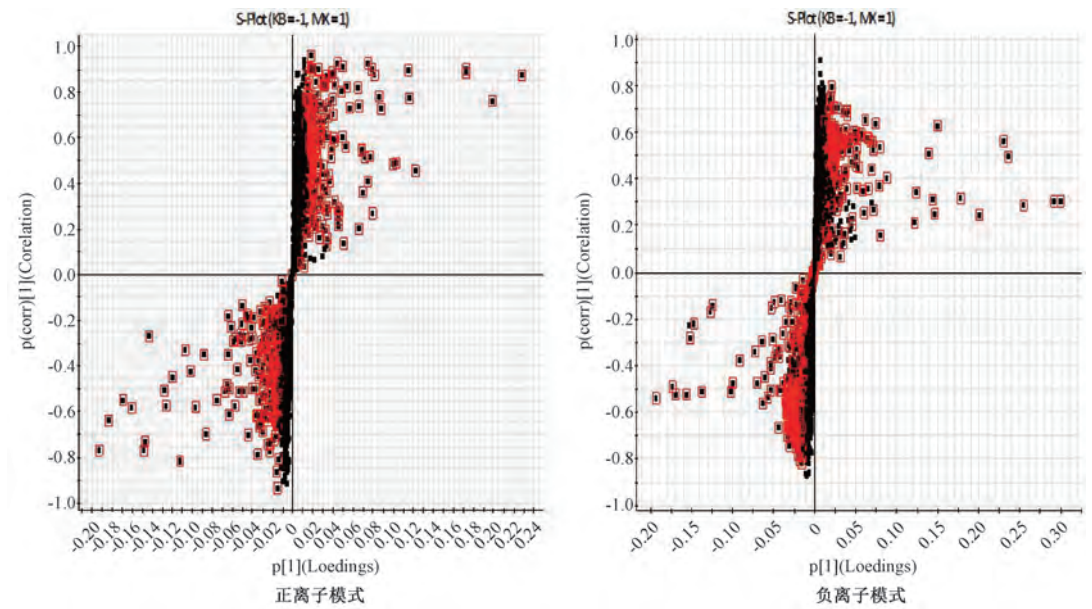


图 6 空白组和模型组 OPLS-DA 分析 S-plot 图

表 2 支气管哮喘引起大鼠血液生物标志物变化详细信息

编号	t/min	m/z	误差(×10 ⁻⁶)	加荷形式	分子式	代谢物名称	变化趋势
1	5.88	287.237 1	0.7	M+H	C ₂₀ H ₃₀ O	维生素 A	降低
2	8.09	626.297 2	-0.1	M+NH ₄	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₆	harderoporphyrin	升高
3	8.04	1 074.693 7	2.5	M+Na	C ₅₄ H ₁₀₁ NO ₁₈	三已糖神经酰胺	降低
4	11.67	701.516 2	6.6	M+H	C ₃₉ H ₇₃ O ₈ P	PA(18:0/18:2(9Z,12Z))	升高
5	10.85	672.488 9	-11.0	M+H	C ₃₇ H ₇₀ NO ₇ P	PE(P-18:1(11Z)/14:1(9Z))	升高
6	2.39	847.452 9	1.0	M+H	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃ P ₂	PGP(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	升高
7	2.28	745.299 5	-6.4	M+Na	C ₃₆ H ₅₀ O ₁₅	苦藏内酯 G	降低
8	10.60	335.166 8	-9.9	M+H	C ₁₅ H ₂₆ O ₈	1,5-甲基羧基柠檬酸二丁酯	降低
9	2.86	632.397 2	7.5	M+NH ₄	C ₃₆ H ₅₆ O ₉	丝瓜皂苷 K	升高
10	14.22	857.516 0	-2.9	M-H	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(16:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	升高
11	3.66	722.508 8	-5.8	M-H	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	PE(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	升高
12	3.66	857.517 0	-1.8	M-H	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(16:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	升高
13	3.68	833.516 4	-2.6	M-H	C ₄₃ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(18:1(11Z)/16:1(9Z))	升高
14	3.99	857.516 5	-2.4	M-H	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(16:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	升高
15	4.01	794.568 0	-3.2	M-H	C ₄₅ H ₈₂ NO ₈ P	PE(20:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	升高
16	4.05	722.508 8	-5.9	M-H	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	PE(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	升高
17	4.13	833.517 2	-1.7	M-H	C ₄₃ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(18:0/16:2(9Z,12Z))	升高
18	4.34	407.279 1	-3.0	M-H	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	猪胆酸	降低
19	5.29	391.284 0	-3.6	M-H	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	胆酸	降低
20	6.99	494.323 3	-3.9	M-H	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	LysoPC(16:0)	降低
21	8.82	522.354 3	-4.2	M-H	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	LysoPC(18:0)	降低

注：变化趋势为模型组与空白组比较。

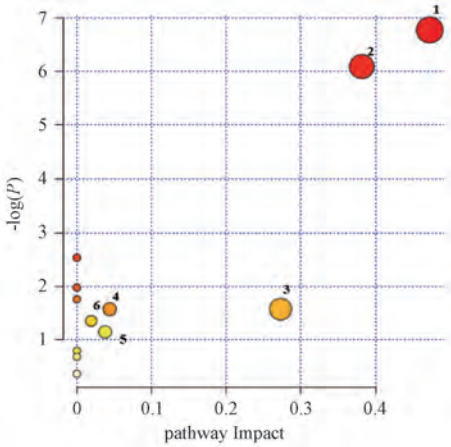


图 7 基于 METPA 的血液支气管哮喘标志物代谢通路分析

表 3 基于 METPA 的哮喘代谢通路分析结果

编号	通路名称	Total	Hits	P	-log(P)	Holm P	伪发现率	Impact
1	甘油磷脂代谢	30	4	0.001 1	6.777 7	0.092 2	0.091 5	0.472 5
2	视黄醇代谢	17	3	0.002 3	6.092 4	0.180 8	0.091 5	0.381 5
3	戊糖和葡萄糖醛酸酯互变	14	1	0.207 6	1.572 2	1.000 0	1.000 0	0.272 7
4	糖基磷脂酰肌醇(GPI)生物合成代谢	14	1	0.207 6	1.572 2	1.000 0	1.000 0	0.043 9
5	淀粉和蔗糖代谢	23	1	0.318 5	1.144 1	1.000 0	1.000 0	0.037 8
6	甘油酯代谢	18	1	0.258 9	1.351 4	1.000 0	1.000 0	0.019 2

注：Total 表示该通路所含的代谢物总数，Hits 表示该通路含有差异性代谢物数。

的发病中，证实了脂代谢与哮喘发生发展的密切关系。

4.1.2 视黄醇代谢 视黄醇代谢也称之为维生素 A 代谢，维生素 A 的减少会诱使肺炎向哮喘发展^[12]，Th1/Th2 平衡漂移，抑制 Foxp3⁺Treg 的高表达，降低 Th1 细胞的产生；能够改变 CD4⁺T 细胞亚群的比例^[13]，造成Ⅱ型细胞因子和 IL-17A 表达升高，造成致敏性炎性损伤。本研究结果显示，

表达，而这些代谢轨迹均与支气管哮喘密切相关。

3.4.5 平喘颗粒对哮喘血清代谢标志物的影响 与模型组比较，平喘颗粒组有 19 种代谢物出现回调 ($P<0.05$)，而地塞米松组仅 2 个 ($P<0.05$)，详见表 4。

4 讨论

4.1 代谢通路分析

4.1.1 甘油磷脂代谢与甘油酯代谢 细胞膜的主要成分为脂类，除了进行细胞生命活动外，还能进行细胞识别、信号传导、能量供应等^[7]。其中甘油酯^[8]和甘油磷脂^[9]协调作用既可稳固细胞膜形态，调节膜蛋白及相关受体蛋白的活性，实现对信号传导的干预^[10]，还可减少 T 细胞因子和 Th2 型细胞因子的分泌，减轻致敏性组织损伤的发生^[11]。

本研究结果显示，甘油磷脂代谢与甘油酯代谢参与哮喘

视黄醇代谢的标志物降低，预示Ⅱ型细胞因子的分泌增多、哮喘症状加剧，也佐证哮喘与视黄醇代谢的密切相关性。

4.1.3 戊糖和葡萄糖醛酸酯互变与淀粉和蔗糖代谢 戊糖与葡萄糖醛酸共同起到维持细胞形态的作用^[14]，促进氧化肌肌醇的形成^[15]，影响细胞活性；对生物体内活性酶的影响，会促使 T 细胞活化Ⅱ型细胞因子分泌，共同起到免疫

表 4 21 个差异代谢标志物回归趋势

编号	t/min	代谢物名称	平喘颗粒	地塞米松
1	5.88	维生素 A	+	-
2	8.09	Harderoporphyrin	+	-
3	8.04	三已糖神经酰胺	+	-
4	11.67	PA(18 : 0/18 : 2(9Z,12Z))	+	-
5	10.85	PE(P-18 : 1(11Z)/14 : 1(9Z))	+	-
6	2.39	PGP(18 : 3(9Z,12Z,15Z)/18 : 3(9Z,12Z,15Z))	+	-
7	2.28	苦藏内酯 G	+	+
8	10.60	1,5-甲基羧基柠檬酸二丁酯	+	-
9	2.86	丝瓜皂苷 K	+	-
10	14.22	PI(16 : 0/20 : 4(8Z,11Z,14Z,17Z))	-	-
11	3.66	PE(P-16 : 0/20 : 4(5Z,8Z,11Z,14Z))	+	-
12	3.66	PI(16 : 0/20 : 4(8Z,11Z,14Z,17Z))	-	-
13	3.68	PI(18 : 1(11Z)/16 : 1(9Z))	+	-
14	3.99	PI(16 : 0/20 : 4(8Z,11Z,14Z,17Z))	+	-
15	4.01	PE(20 : 0/20 : 4(5Z,8Z,11Z,14Z))	+	-
16	4.05	PE(P-16 : 0/20 : 4(5Z,8Z,11Z,14Z))	+	+
17	4.13	PI(18 : 0/16 : 2(9Z,12Z))	+	-
18	4.34	猪胆酸	-	-
19	5.29	胆酸	+	-
20	6.99	LysoPC(16 : 0)	+	-
21	8.82	LysoPC(18 : 0)	+	-

注：+表示给药后代谢物呈现回归趋势，-表示给药后代谢物未见回归趋势。

损伤的危害^[16-17]。本研究结果显示，这 2 条通路异常，证实哮喘发生时出现能量代谢异常和免疫损伤。

4.1.4 糖基磷脂酰肌醇（GPI）生物合成代谢 GPI 常作为炎症的标志物，预示机体激活基质金属蛋白酶的表达^[18]，刺激分泌 Th2/Th17 细胞因子^[19]，诱导 Th1/Th2 应答，导致细胞介导和体液性免疫发展^[20]。本研究结果显示，GPI 的相关生物标志物含量剧烈波动，预示着免疫系统的激变。

4.2 生物标志物的生物信息分析

4.2.1 磷脂类生物标志物 磷脂醇（PA）参与活性氧（ROS）反应、信号转导、膜运输、分泌和细胞骨架重排等过程，调节肺上皮细胞中趋化因子、细胞因子和细胞因子受体的表达，同Ⅱ型 T 细胞和炎症密切相关^[21]。其分解物还增加气道高反应性、炎症的聚集和 Th2 型细胞因子的释放^[22]。本研究结果显示，平喘颗粒可以调控磷脂类生物标志物的分泌，说明其可抑制机体脂代谢的异常、炎症、免疫损伤等。

4.2.2 胆汁酸类生物标志物 熊去氧胆酸具有调节免疫的功效，抑制嗜酸性粒细胞的活化，抑制上皮细胞重塑^[23]。本研究结果显示，平喘颗粒可促进熊去氧胆酸分泌，调控哮喘病程的发展。

4.2.3 其他类物标志物 维生素 A 能抑制Ⅱ型 T 细胞的极化，减轻嗜酸性粒细胞的募集，而减少致敏性损伤的发生^[24]。harderoporphyrin 酶是机体内源性代谢紊乱的标志^[25]。trihexosylceramide（d18：1/18：0）可影响免疫进程，抑制组蛋白去乙酰化酶^[26]。physagulin G 和 1，5-羟甲基柠檬酸二丁酯在抗氧化、抗炎等方面有较强的作用^[27]。本研究结果显示，平喘颗粒可促进机体对维生素 A 的摄取，可调控 harderoporphyrin 的升高与 trihexosylceramide（d18：1/18：0）的降低，回调 physagulin G、1，5-羟甲基柠檬酸二丁酯的降低。

4.3 生化指标评价 Th2 细胞优势应答是支气管哮喘的神经免疫及气道免疫等方面的免疫学基础，Th2 型细胞因子中 IL-4 和 IL-13 水平的平衡，在气道慢性免疫反应的 Th1/Th2 平衡中起到关键作用，既可影响气道上皮的黏膜屏障，增加上皮屏障的通透性，使气道的神经免疫功能受损^[28]，还可破坏气道黏膜的离子平衡，导致气道重塑^[29]。本研究发现哮喘大鼠血清 IL-4、IL-13 水平升高，也提示 IL-4、IL-13 可作为治疗哮喘的优势靶点，亦可作为构建哮喘大鼠模型相关免疫指标的标记之一。

代谢组学是从整体或者多系统组合来验证疾病的演变过程，也体现了中药治疗疾病的多靶点特性。本研究通过对给药组各样本代谢轮廓和生物标志物变化的分析，再结合模式识别分析技术进行主成分分析，发现平喘颗粒具有良好的回调紊乱内环境的能力，而且从生物标志物的生物学意义分析也证实其具有较强的调控免疫、修复肺组织的能力。

参考文献：

[1] 刘元元，赵欢欢，屠新敏，等. 支气管哮喘中医证候与炎症表型、生存质量的相关性研究[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2023，25(3)：1020-1027.

[2] 刘建秋，高风丽，李竹英. 温阳益气化痰平喘方治疗支气管哮喘慢性持续期临床研究[J]. 中国中医急症，2014，23(12)：2172-2173；2219.

[3] 蒋鹏娜，李竹英，孙国东，等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术

的平喘颗粒化学成分分析[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(5): 42-53.

[4] 蒋鹏娜, 张佩青, 王丽洁. 平喘颗粒对气道高反应大鼠气道重塑的干预作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(8): 1528-1533.

[5] 蒋鹏娜, 王丽洁, 李 星, 等. 平喘颗粒对气道上皮细胞自噬及凋亡的抑制作用探讨[J]. 中国中医急症, 2020, 29(11): 1902-1905.

[6] 张碧海, 蒋鹏娜. 平喘颗粒对哮喘大鼠肺组织 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(2): 176-180.

[7] Li H, Feng Z, He M L. Lipid metabolism alteration contributes to and maintains the properties of cancer stem cells [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 7053-7069.

[8] Athenstaedt K, Daum G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(12): 1355-1369.

[9] Tappia P S, Singal T. Phospholipid-mediated signaling and heart disease[J]. *Subcell Biochem*, 2008, 49: 299-324.

[10] Marsh D. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes[J]. *Biophys J*, 2007, 93(11): 3884-3899.

[11] Insuela D B R, Ferrero M R, Coutinho D S, *et al.* Could arachidonic acid-derived pro-resolving mediators be a new therapeutic strategy for asthma therapy? [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 580598.

[12] Julia V, Macia L, Dombrowicz D. The impact of diet on asthma and allergic diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15 (5) : 308-322.

[13] Tian Y, Tian Q, Wu Y, *et al.* Vitamin A supplement after neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia inhibits the progression of experimental asthma by altering CD4⁺ T cell subsets[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 4214.

[14] Kärkönen A, Murigneux A, Martinant J P, *et al.* UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis[J]. *Biochem J*, 2005, 391(Pt 2): 409-415.

[15] Loewus F, Murthy P P N. Myo-inositol metabolism in plants[J]. *Plant Sci*, 2000, 150: 1-19.

[16] Boulland M L, Marquet J, Valérie M F, *et al.* Human IL4I1 is a secreted *L*-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation[J]. *Blood*, 2007, 110(1): 220-227.

[17] Castellano F, Molinier-Frenkel V. Control of T-cell activation and signaling by amino-acid catabolizing enzymes[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 613416.

[18] Liu Y, Sun X, Feng J, *et al.* MT2-MMP induces proteolysis and leads to EMT in carcinomas [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 48193-48205.

[19] Abbasnia T, Asoodeh A, Habibi G, *et al.* Isolation and purification of glycosylphosphatidylinositols (GPIs) in the schizont stage of *Theileria annulata* and determination of antibody response to GPI anchors in vaccinated and infected animals[J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1): 82.

[20] Kumar S, Gowda N M, Wu X, *et al.* CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells[J]. *Parasite Immunol*, 2012, 34(7): 372-382.

[21] Zhao Y, He D, Zhao J, *et al.* Lysophosphatidic acid induces interleukin-13 (IL-13) receptor alpha2 expression and inhibits IL-13 signaling in primary human bronchial epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14) : 10172-10179.

[22] Wang S, Tang K, Lu Y, *et al.* Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 513: 34-42.

[23] Işık S, Karaman M, Çilaker M S, *et al.* Beneficial effects of ursodeoxycholic acid *via* inhibition of airway remodelling, apoptosis of airway epithelial cells, and Th2 immune response in murine model of chronic asthma [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2017, 45(4): 339-349.

[24] Cui W, Zhang P, Gu J, *et al.* Vitamin A deficiency promotes inflammation by induction of type 2 cytokines in experimental ovalbumin-induced asthma murine model [J]. *Inflammation*, 2016, 39: 1798-1804.

[25] Jutila A A, Zignego D L, Hwang B K, *et al.* Candidate mediators of chondrocyte mechanotransduction *via* targeted and untargeted metabolomic measurements [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 545: 116-123.

[26] Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 58-67.

[27] Wang L, Lu S, Wang L, *et al.* Anti-inflammatory effects of three withanolides isolated from *Physalis angulata* L. in LPS-activated RAW 264.7 cells through blocking NF-κB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114186.

[28] Oeser K, Maxeiner J, Symowski C, *et al.* T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma [J]. *Allergy*, 2015, 70(11): 1440-1449.

[29] Wang B, Gao Y, Zheng G, *et al.* Platycodin D inhibits interleukin-13-induced the expression of inflammatory cytokines and mucus in nasal epithelial cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1108-1112.