

· 药物代谢 ·

铁线蕨总黄酮提取物对哮喘模型大鼠血清代谢物的影响

阿依古·吐热克¹, 阿不都热依木·玉苏甫²,
巴吐尔·买买提明¹, 米合勒阿依·艾克帕¹, 麦合苏木·艾克木^{1*}
(1. 新疆医科大学维吾尔医学院, 中心实验室, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆维吾尔自治区中医民族医药管理局, 乌鲁木齐 830001)

[摘要] 目的:探讨铁线蕨总黄酮提取物(TXJF)对哮喘大鼠血清代谢物的影响。方法:在建立哮喘大鼠模型的基础上,哮喘模型大鼠灌胃给予TXJF,观测肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数及淋巴细胞(Ly),中性粒细胞(Neu),嗜酸性粒细胞(Eos)的百分比;检测肺组织病理变化;测定大鼠血清中免疫球蛋白E(IgE),白细胞介素-4(IL-4),IL-5的浓度。利用核磁共振氢谱技术(¹H-NMR)检测,建立大鼠血清代谢物的指纹图谱,运用偏小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏小二乘法-判别分析(OPLS-DA)观察各组血清中代谢产物的差异性。结果:与哮喘模型组比较,TXJF给药组BALF中白细胞总数及炎症细胞百分比均明显下降,肺组织病理情况有明显改善。TXJF高、中剂量组血清IgE,IL-4,IL-5浓度较哮喘模型组明显下降。PLS-DA结果显示,哮喘模型组与正常组,TXJF给药组轮廓区分明显分开。与正常组比较,哮喘模型组血清中亮氨酸、糖蛋白、甘氨酸、丙氨酸等代谢产物含量均显著下降;乳酸、极低密度脂蛋白(VLDL)和丙酮等含量显著升高。TXJF高剂量组血清中的亮氨酸、丙氨酸、糖蛋白、甘氨酸等化合物含量较哮喘模型组均出现升高;丙酮、乳酸、不饱和脂肪酸及VLDL等化合物含量减少。结论:TXJF具有改善哮喘大鼠模型肺组织病理学变化,降低血清IgE,IL-4,IL-5浓度且能影响血清代谢物的作用;作用机制可能与其参与哮喘模型大鼠体内的氨基酸代谢、能量代谢、脂肪代谢和糖代谢等途径有关。

[关键词] 铁线蕨;总黄酮提取物;大鼠哮喘模型;血清代谢物;氨基酸;肺泡灌洗液;极低密度脂蛋白

[中图分类号] R22;R283.6;R284;R969.1;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0076-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181305

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1319.024.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 17:58

Effect of Total Flavonoids Extract of *Adiantum capillus-veneris* on Serum Metabolites in Asthmatic Rat Model

AYIGU · Tureke¹, ABDIRYIM · Yusup², BATUER · Mantimin¹,
MIHELEAYI · Aikepa¹, MAIHESUMU · Aikemu^{1*}

(1. Central Laboratory, Institute of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Group Medicine of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of total flavonoids extract of *Adiantum capillus-veneris* (TXJF) on serum metabolites of asthmatic rats. **Method:** Based on the establishment of asthmatic rat model, asthma model rats were given TXJF by intragastric administration, then to observe the percentage of leukocyte in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and pathological changes of lung tissue; levels of immunoglobulin E (IgE),

[收稿日期] 20171208(016)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区中医民族医药管理局人才培养计划项目(2016-03)

[第一作者] 阿依古·吐热克,在读硕士,从事维吾尔医药药效物质基础及作用机制研究,E-mail:3452163016@qq.com

[通信作者] *麦合苏木·艾克木,硕士,副教授,从事维吾尔医药药效物质基础及作用机制研究,E-mail:mahsum008@126.com

interleukin-4 (IL-4) and IL-5 in serum of rats were detected. $^1\text{H-NMR}$ was employed to establish fingerprints of serum metabolites in rats, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were adopted to analyze the differences in serum metabolites. **Result:** Compared with asthma model group, total number of leukocytes and inflammatory cells in BALF of TXJF administration group were decreased and the pathological changes of lung tissue were significantly alleviated. The levels of IgE, IL-4 and IL-5 in serum from TXJF high and middle dose groups were significantly lower than those in the asthma model group. The results of PLS-DA showed that the contour differentiation between the asthma model group and the normal group, the TXJF administration group was distinctly separated. Compared with the normal group, the levels of leucine, glycoprotein, glycine, alanine and other metabolites in serum of the asthma model group were decreased; the contents of lactic acid, very low density lipoprotein (VLDL) and acetone were increased ($P < 0.05$). In the TXJF high dose group, the contents of leucine, alanine, glycoprotein, glycine and other compounds were all higher than those of the asthma model group; the contents of acetone, lactic acid, unsaturated lipids, VLDL and other compounds were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** TXJF can improve the pathological changes of lung tissue in asthmatic rats, decrease concentrations of IgE, IL-4 and IL-5 in serum and affect the effect of serum metabolites; its mechanism may be related to amino acids metabolism, energy metabolism, fat metabolism and glucose metabolism in asthmatic rat model.

[**Key words**] *Adiantum capillus-veneris*; total flavonoids extract; asthmatic rat model; serum metabolites; amino acids; bronchoalveolar lavage fluid; very low density lipoprotein

铁线蕨的药性属于二级湿热,具有止咳化痰、平喘利肺、促进机体的自然随和、利尿消肿、解毒、通经、消炎止痛、固实毛发等功效,主治哮喘、伤风感冒、气短咳喘、肺炎、咳嗽痰多、头疼胸痛、闭经闭尿、毛发脱落等证^[1]。现代医学研究发现铁线蕨含有黄酮类、挥发油、多糖类、生物碱类及萜类等化学成分^[2],具有抗炎抑菌、控制血糖、抗氧化、抗肿瘤、利尿排石、镇痛、促进毛发生长和伤口愈合等作用^[3-8]。

本课题组前期研究发现铁线蕨总黄酮提取物(TXJF)具有显著的抗炎、平喘、止咳及祛痰作用,并呈剂量依赖性^[8]。但其抗哮喘作用及机制尚不明确。哮喘是一种累积多种炎性细胞的慢性气道炎症性疾病,由于其发病机制与发展过程复杂,至今对其机制尚阐述清楚。代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,具有整体、动态、综合与分析的特点,与中医学的整体、系统观念及辨证论治方式不谋而合,已被越来越多地应用于中药药效及其作用机制等研究方面^[9-11]。本实验在建立大鼠哮喘模型的基础上,利用 TXJF 进行干预,观察肺组织的病理变化,测定肺泡灌洗液中细胞总数和炎症细胞占比,以及大鼠血清免疫球蛋白 E(IgE),白细胞介素(IL)-4 和 IL-5 的浓度,运用核磁共振氢谱技术($^1\text{H-NMR}$)探究 TXJF 对大鼠哮喘模型血清代谢产物的影响,为 TXJF 的抗哮喘作用及其机制研究提供实验依据。

1 材料

C2500-R-230V 型高速离心机(美国 Labnet 公司);ICV-450 型电热恒温培养箱(日本 ASONE 公司);MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);W004 型压缩式雾化器(江苏富林医疗设备有限公司);Inova-600 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司);GS-15R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司);DW-86L286 型超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);WG-1000-7 型核磁管(美国 Wilmad-Labglass 公司);BSA224S-CW 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);RM2245 型病理切片机,100-04 型图像分析仪和 DM 3000 型显微镜(德国 Leica 公司)。

铁线蕨 5 kg 购自新疆维吾尔自治区维吾尔医学院药房,经该院艾尼瓦尔·塔力甫主任药师鉴定为铁线蕨科植物铁线蕨 *Adiantum capillus-veneris* 的全草;卵清蛋白(美国 Sigma 公司,批号 A5253);20% 氢氧化铝胶生理盐水(齐鲁动物保健品有限公司,批号 1507006);醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 151288);0.9% 氯化钠注射液(国药集团新疆制药有限公司,批号 1608008);4% 多聚甲醛固定液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 AR10680);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海蕊试生物技术有限公司,批号 C0106, C0107);重水(美国 CIL 公司,批号 R03010104);小牛血清(上海

慧颖生物科技有限公司,批号 16010-159);大鼠免疫球蛋白 E(IgE),白细胞介素(IL)-4 和 IL-5 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 E-EL-R0517c, E-EL-R0014c, E-EL-R0558c)。

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(200 ± 30) g,购自新疆医科大学动物实验研究中心,合格证号 SCXK(新)2016-0003,本文涉及的动物实验符合新疆医科大学实验动物伦理标准。

2 方法

2.1 铁线蕨总黄酮提取物(TXJF)的制备^[12] 称取铁线蕨药材 5 kg,加 25 倍量 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,收集提取液,减压浓缩得铁线蕨提取物。以聚酰胺树脂吸附法纯化,选用 60 ~ 100 目聚酰胺树脂,将聚酰胺树脂用水和无水乙醇各 3 BV 洗脱除杂后开始上样,上样液质量浓度 5.412 6g·L⁻¹,流速 1.0 mL·min⁻¹,上样完成后加 70% 乙醇 6 BV 洗脱,收集第 2 ~ 6 BV 洗脱液,减压浓缩,恒温真空干燥,得铁线蕨总黄酮粉末,备用。以芦丁为对照品,NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 为显色剂,采用紫外-分光光度法测得铁线蕨总黄酮的质量分数 51.01%。

2.2 动物分组、造模及给药 将 SD 大鼠 60 只随机分成 6 组,每组 10 只,分别为正常组、哮喘模型组、醋酸地塞米松组及 TXJF 高、中、低剂量组,各组动物均在清洁动物房内用普通饲料饲养,相对湿度 60% ~ 80%,温度(26 ± 3) °C,自由饮食和饮水。大鼠适应环境 1 周后,除正常组以外,其余各组分别于第 1,8 天以腹腔注射 10% 卵清蛋白混合溶液[卵清蛋白(OVA)10 g + 氢氧化铝胶生理盐水 100 g]1 mL 致敏,正常组以生理盐水 1 mL 代替,从第 15 天开始每天将正常组(等量生理盐水),哮喘模型组(等量生理盐水),醋酸地塞米松组(0.3 mg·kg⁻¹)及 TXJF 高、中、低剂量组(0.8,0.4,0.2 g·kg⁻¹)大鼠灌胃给药 0.5 h 后分别置于密闭式自制有机玻璃雾化箱内,以 10% OVA 雾化吸入 20 min 激发引喘,每天 1 次,连续 16 d。

2.3 标本采集 由大鼠腹主动脉取血,收集好的血液离心(4 °C,3 000 r·min⁻¹,10 min,下同)分离血清,于 -80 °C 冰箱保存,用于血清 IgE,IL-4,IL-5 质量浓度测定;迅速打开胸腔,露出气管和肺,从甲状软骨上部切开 V 形裂口,插入磨平的针头,用线结扎固定,注入 5% 生理盐水(冷藏)3 mL,立刻回抽,收集肺泡灌洗液(BALF),灌洗 3 次,回收的 BALF 离心处理。将沉淀物在 -4 °C 冰箱内保存,用于

BALF 中细胞总数计数及分类。取大鼠右肺中叶,以 4% 多聚甲醛溶液固定,组织石蜡包埋,于内 1/3 处进行连续切片(切片厚度约 3 μm),以 HE 染色试剂盒进行染色,观察肺组织炎症细胞浸润情况。

2.4 BALF 中炎症细胞总数计数及分类及血清 IgE,IL-4,IL-5 水平检测 将 BALF 离心后沉积物用含 10% 小牛血清的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2 ~ 7.6)100 μL 悬浮细胞,吸取 0.1 mL 置于细胞计数板上,细胞总数在显微镜下计数。取 0.01 mL 涂片,制作 3 张涂片及瑞氏染色,进行细胞计数分类,测量白细胞总数与淋巴细胞(Ly),中性粒细胞(Neu),嗜酸性粒细胞(Eos)的百分比。严格按照大鼠血清 IgE,IL-4,IL-5 水平 ELISA 试剂盒说明书分别检测各组大鼠血清中 IgE,IL-4,IL-5 的水平。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析法进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性差异。

2.6 血清样品的处理 血清室温解冻后,精密吸取 200 μL,混于 400 μL 的 PBS(以重水,NaCl 0.9 g, K₂HPO₄ 882.98 mg, NaH₂PO₄ 141.8 mg 配成体积达到 100 mL,pH 7.4)中,室温放置 10 min 后于转速 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 550 μL 移至 5 mm 核磁管中,待 NMR 检测。

2.7 ¹H-NMR 数据采集与预处理 血清 NMR 检测在核磁共振波谱仪上采用 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)脉冲序列[RD-90°(τ180°-τ)n-ACQ]进行,频率 600 MHz,扫描数 128 次,采样点数 32 k,谱宽 1 万 Hz,采样时间 1.64 s,采样值延时 2 s,测试温度 25 °C,用预饱和方式来抑制水峰。以乳酸(δ 1.32 ppm)质子信号作为化学位移参考峰的位置后调整基线。将¹H-NMR 图谱在化学位移 δ 0.5 ~ 9 ppm 以 δ 0.003 ppm 积分区间进行分段积分,剪去 δ 4.7 ~ 5.2 ppm 的水峰。将出现的所有积分数据用 Excel 文件格式保存,所得到的数据文件用 SIMCA-P⁺ 11 统计软件进行偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。

3 结果

3.1 哮喘模型动物一般状态 哮喘模型组在雾化激发引喘过程中均出现皮肤瘙痒、绕鼻、腹式呼吸、呼吸频率加快加深、焦躁不安、仰头张口呼吸、四肢瘫软、二便失禁等系列症状。正常组未出现上述症状,醋酸地塞米松组及 TXJF 高、中、低剂量组大鼠上述症状均有不同程度的改善。

3.2 肺组织 HE 染色观察及分析 正常组支气管

黏膜上皮组织完整,肺泡壁,间隔及腔内无炎症细胞浸润。哮喘模型组支气管壁及伴行血管周围有大量的淋巴细胞及嗜酸性粒细胞浸润,气道黏膜皱褶增多,出现黏膜脱落,平滑肌增厚,管腔变窄痉挛,部分肺泡壁破裂并相互融合而形成肺大泡。醋酸地塞米松组与 TXJF 高、中、低剂量组中上述情况较哮喘模型组均有所改善,但未痊愈,见图 1。

3.3 BALF 中的白细胞总数及 Ly, Eos, Neu 百分比的比较 哮喘模型组大鼠 BALF 中白细胞总数及 Ly, Neu, Eos 百分比明显高于正常组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, TXJF 高、中、低剂量组大鼠 BALF 中白细胞总数及 Ly, Neu, Eos 百分比明显下降 ($P < 0.05$), 且呈剂量的依赖性, 见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 中白细胞总数及炎症细胞占比, 血清 IgE, IL-4, IL-5 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of total number of leukocytes and proportion of inflammatory cells in BALF, levels of IgE, IL-4 and IL-5 in serum of rats from each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	白细胞总数 ($\times 10^8$)/ (个/L)	Ly 百分比 /%	Eos 百分比 /%	Neu 百分比 /%	IgE / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-4 /ng·L ⁻¹	IL-5 /ng·L ⁻¹
正常	-	1.59 ± 0.32	1.33 ± 0.41	0.78 ± 0.68	1.11 ± 0.87	152.98 ± 42.31	9.71 ± 1.87	7.67 ± 1.10
哮喘模型	-	12.51 ± 1.49 ¹⁾	6.37 ± 0.39 ¹⁾	11.71 ± 1.89 ¹⁾	4.29 ± 1.23 ¹⁾	399.70 ± 76.86 ¹⁾	24.95 ± 5.09 ¹⁾	17.34 ± 3.06 ¹⁾
醋酸地塞米松	0.3	2.99 ± 0.61 ²⁾	2.11 ± 0.43 ²⁾	2.21 ± 0.38 ²⁾	2.10 ± 0.54 ²⁾	205.14 ± 24.56 ²⁾	12.59 ± 1.44 ²⁾	8.33 ± 0.99 ²⁾
TXJF	800	1.84 ± 0.11 ²⁾	2.11 ± 0.54 ²⁾	1.95 ± 0.43 ²⁾	2.08 ± 1.08 ²⁾	230.19 ± 35.57 ²⁾	12.92 ± 2.00 ²⁾	9.70 ± 1.25 ²⁾
	400	2.91 ± 0.12 ^{2,3)}	2.14 ± 0.84 ²⁾	2.18 ± 0.31 ^{2,3)}	2.64 ± 0.84 ²⁾	262.36 ± 52.67 ^{2,3)}	14.78 ± 2.21 ^{2,3)}	10.88 ± 2.44 ^{2,3)}
	200	4.36 ± 0.32 ^{2,3)}	3.07 ± 0.31 ^{2,3)}	3.17 ± 0.78 ^{2,3)}	3.04 ± 0.62 ^{2,3)}	296.50 ± 82.02 ^{2,3)}	17.78 ± 3.80 ^{2,3)}	11.79 ± 2.05 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与哮喘模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与 TXJF 高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 大鼠血清 IgE, IL-4, IL-5 水平的检测 支气管哮喘是以 IgE 为介导的 I 型变态反应, 血清高 IgE 水平是哮喘的主要特征性指标之一。结果显示与正常组比较, 哮喘模型组血清 IgE, IL-4, IL-5 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与哮喘模型组比较, 醋酸地塞米松组及 TXJF 高、中剂量组大鼠血清 IgE, IL-4, IL-5 水平均明显下降 ($P < 0.05$), 但 TXJF 低剂量组血清 IgE, IL-4, IL-5 水平变化不明显。见表 1。

3.5 血清中主要代谢物的¹H-NMR 归属 各组大鼠血清中主要代谢物的变化情况见图 2。¹H-NMR 分析结果显示, 大量内源性代谢产物[极低密度脂蛋白(VLDL), 亮氨酸, 蛋氨酸, 乳酸, 糖蛋白, 甘氨酸, β -葡萄糖, 肉碱, α -葡萄糖, 丙酮, 谷氨酸, 肌酸, 酪氨酸, 不饱和脂类等]的含量发生了变化。这些代谢物存在于氨基酸代谢、糖代谢、脂类代谢和能量代谢等对机体非常重要的生物化学转化过程中。

3.6 模式识别分析 将¹H-NMR 图谱分段积分后得出的积分值进行 PLS-DA 与 OPLS-DA 处理, 得 3D

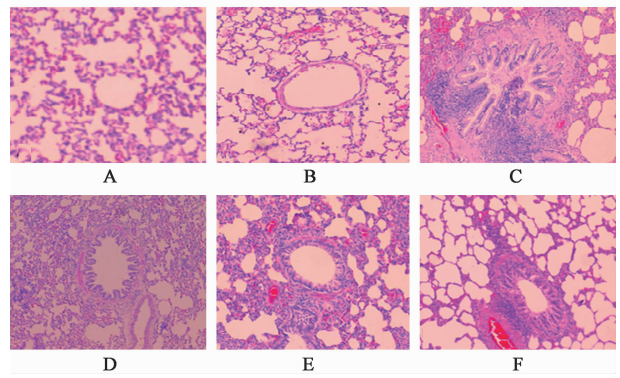


图 1 各组大鼠肺组织的病理变化情况 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue in all groups (HE, $\times 200$)

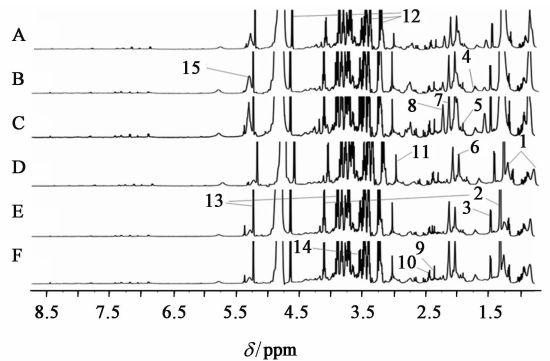


图 2 各组大鼠血清的¹H-NMR

Fig. 2 ¹H-NMR of serum in all groups

空间图与平面散点图。图中每 1 个点代表 1 个样本, 可直观地反应出血清标本在空间上的位置, 各组样品分布区域基本分开, 组之间基本无交叉或重叠的情况, 见图 3。 R^2 是所解释的模型差异, Q^2 是所预测的模型差异。PLS-DA 分析结果显示 $R^2 X =$

0.492, $R^2 Y = 0.23$, $Q^2 = 0.439$; 这 3 个参数的值越接近于 1, 代表模型拟合度越好, 反之则拟合度越差, 一般认为模型的预测结果达到“良”的标准必须使 $Q^2 > 0.4$ 。结果中 $Q^2 > 0.4$ 即可认为该模型有一定的可靠性, 说明各组大鼠血清代谢成分上有一定的差异性。从样本空间分布情况可知, 各组大鼠血清代谢轮廓完全分开, 各组样本的代谢物存在显著性差异。由 OPLS-DA 可知, 正常组与哮喘模型组, 哮喘模型组与醋酸地塞米松组, TXJF 高剂量组与哮喘模型组, TXJF 中剂量组与哮喘模型组, TXJF 低剂量组与哮喘模型组的分布区域是完全分开的, 无交

叉, 无重叠, Q^2 依次为 0.768, 0.78, 0.676, 0.749 和 0.514, 见图 4~8。

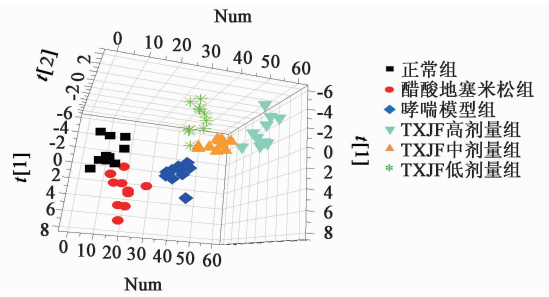


图 3 各组大鼠血清 PLS-DA 的 3D 空间分布
Fig.3 3D spatial distribution of serum in rats from all groups by PLS-DA

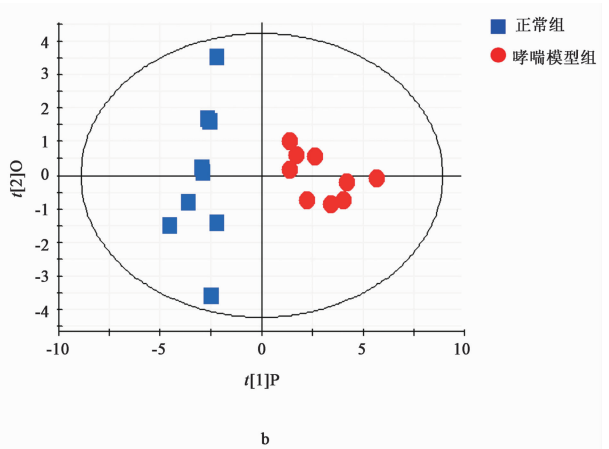
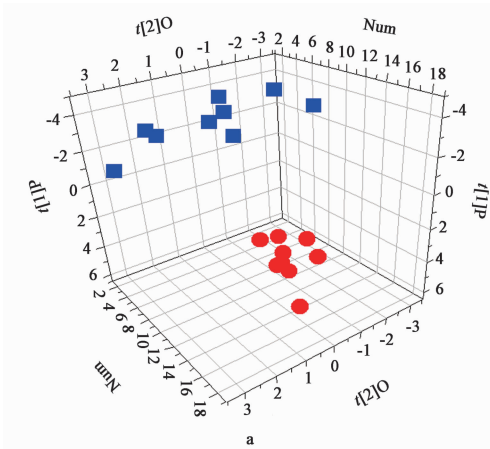


图 4 正常组与哮喘模型组大鼠血清 OPLS-DA 的 3D 空间分布 (a) 和散点 (b)
Fig.4 3D spatial distribution (a) and scatter plots (b) of serum in rats from normal group and asthma model group by OPLS-DA

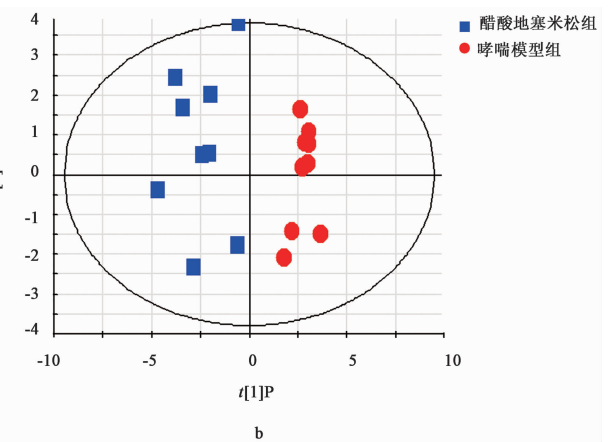
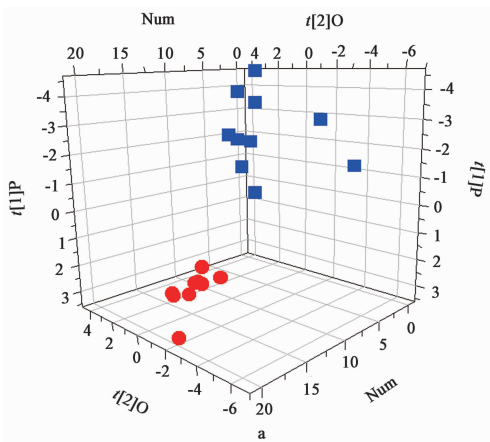


图 5 醋酸地塞米松组与哮喘模型组大鼠血清 OPLS-DA 的 3D 空间分布 (a) 和散点 (b)
Fig.5 3D spatial distribution (a) and scatter plots (b) of serum in rats from dexamethasone acetate group and asthma model group by OPLS-DA

3.7 各组大鼠血清中的差异性代谢物 正常组与哮喘模型组、哮喘模型组与醋酸地塞米松组、哮喘模型组与 TXJF 各剂量组血清中的差异性代谢物及相关系数见表 2。结果与正常组相比, 哮喘模型组中亮氨酸、糖蛋白、蛋氨酸、甘氨酸、肉碱、酪氨酸、肌

酸, 丙氨酸和 α -葡萄糖等化合物的含量显著下降; 乳酸、丙酮和 VLDL 等的含量明显升高, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与哮喘模型组相比, 醋酸地塞米松组中亮氨酸, 糖蛋白, 谷氨酸, 肌酸, 酪氨酸, β -葡萄糖和 α -葡萄糖等化合物含量升高; VLDL

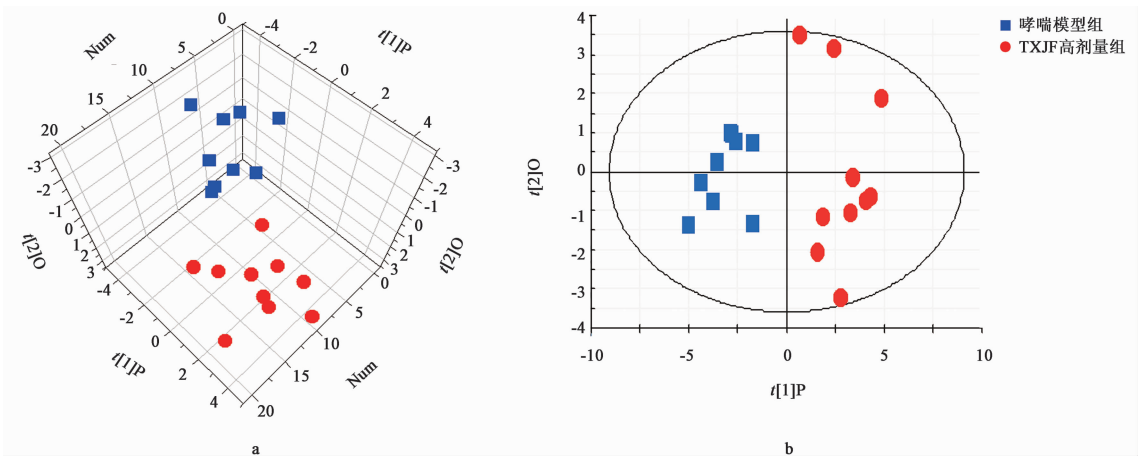


图 6 哮喘模型组与 TXJF 高剂量组大鼠血清 OPLS-DA 的 3D 空间分布 (a) 和散点 (b)

Fig. 6 3D spatial distribution (a) and scatter plots (b) of serum in rats from TXJF high-dose group and asthma model group by OPLS-DA

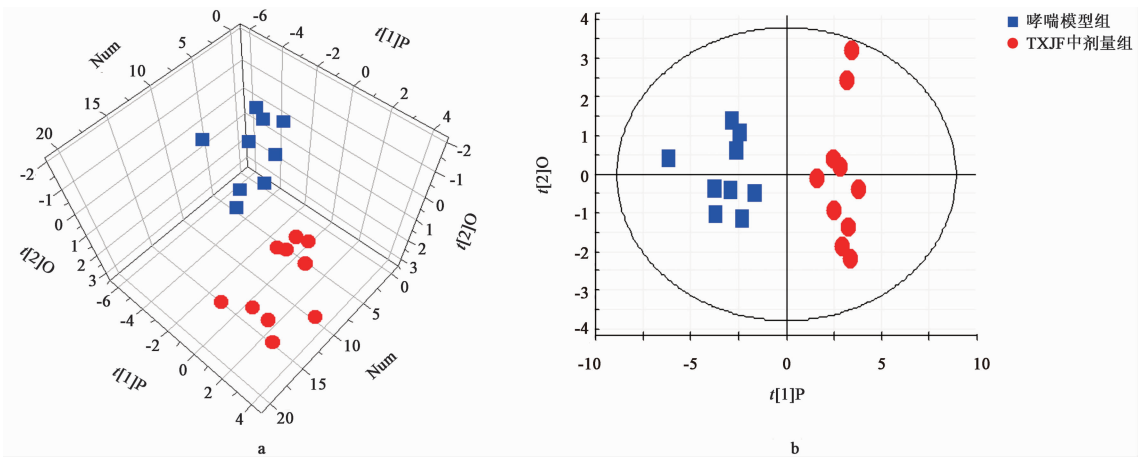


图 7 哮喘模型组与 TXJF 中剂量组大鼠血清 OPLS-DA 的 3D 空间分布 (a) 和散点 (b)

Fig. 7 3D spatial distribution (a) and scatter plots (b) of serum in rats from TXJF middle-dose group and asthma model group by OPLS-DA

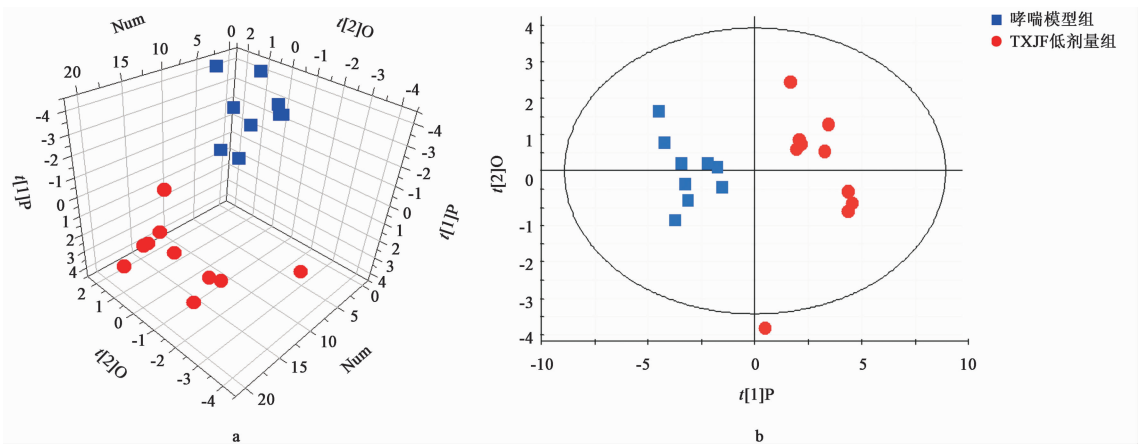


图 8 哮喘模型组与 TXJF 低剂量组大鼠血清 OPLS-DA 的 3D 空间分布 (a) 和散点 (b)

Fig. 8 3D spatial distribution (a) and scatter plots (b) of serum in rats from TXJF low-dose group and asthma model group by OPLS-DA

和乳酸、不饱和脂类、丙酮、丙氨酸等含量减少,且差异具有统计意义($P < 0.05$)。与哮喘模型组相比, TXJF 高剂量组中亮氨酸,丙氨酸,糖蛋白,蛋氨酸,谷氨酸,肉碱,肌酸,酪氨酸, β -葡萄糖, α -葡萄糖及

甘氨酸等化合物含量升高;VLDL 和丙酮、乳酸、不饱和脂类等化合物含量减少,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与哮喘模型组相比, TXJF 中剂量组血清中丙氨酸、亮氨酸、糖蛋白、蛋氨酸、谷氨

酸、肉碱、肌酸、酪氨酸、甘氨酸和 α -葡萄糖等化合物含量均明显升高;VLDL 和乳酸、不饱和脂类、丙酮等含量均下降,且具有统计学意义($P < 0.05$);与哮喘模型组比较, TXJF 低剂量组中亮氨酸,丙氨

酸,谷氨酸,酪氨酸,甘氨酸, β -葡萄糖, α -葡萄糖等化合物含量均明显升高;VLDL 和不饱和脂类、乳酸、丙酮等含量显著下降,且差异有统计意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 OPLS-DA 得出的主要差异性代谢物及其相关系数

Table 2 Main differential metabolites and their correlation coefficients of serum in rats from all groups by OPLS-DA

No.	代谢物	δ /ppm	相关系数				
			正常组-哮喘模型组	醋酸地塞米松组-哮喘模型组	TXJF 高剂量组-哮喘模型组	TXJF 中剂量组-哮喘模型组	TXJF 低剂量组-哮喘模型组
1	VLDL	0.88 (m), 1.27 (m), 1.57 (m), 2.00 (m), 2.22 (m), 2.75 (m)	0.93	0.64	0.84	0.96	0.89
2	乳酸	1.32 (d), 4.11 (q)	0.77	0.64	0.80	0.98	0.81
3	丙氨酸	1.47 (d), 3.76 (q)	-0.67	0.73	-0.86	-0.73	-0.69
4	亮氨酸	1.72 (m)	-0.72	-0.78	-0.87	-0.83	-0.81
5	糖蛋白	2.03 (s)	-0.82	-0.47	-0.95	-0.94	-
6	蛋氨酸	2.14 (s)	-0.79	0.48	-0.71	-0.66	-
7	丙酮	2.23 (s)	0.92	0.66	0.89	0.95	0.80
8	谷氨酸	2.37 (m)	-0.57	-0.42	-0.78	-0.70	-0.68
9	肉碱	2.45 (q)	-0.75	-	-0.87	-0.84	-
10	肌酸	3.03 (s)	-0.69	-0.63	-0.84	-0.72	-
11	酪氨酸	3.93 (d)	-0.62	-0.59	-0.49	-0.64	-0.95
12	β -葡萄糖	3.24 (dd), 3.40 (t), 3.49 (t), 3.90 (dd), 4.64 (d)	-0.82	-0.81	-0.71	-	-0.61
13	α -葡萄糖	3.53 (dd), 3.72 (dd), 5.23 (d)	-0.77	-0.85	-0.55	-0.71	-0.73
14	甘氨酸	3.56 (s)	-0.82	-	-0.89	-0.81	-0.88
15	不饱和脂类	5.31 (m)	0.81	0.39	0.85	0.94	0.83

注:s. 单峰;d. 双重峰;t. 三重峰;q. 四重峰;m. 多峰;dd. 双重双重峰。

4 讨论

铁线蕨常用于防治呼吸道疾病,疗效显著。其总黄酮提取物抗炎、平喘作用最显著,但其作用机制尚不明确。因此,本研究在建立了哮喘大鼠模型的基础上,采用 TXJF 干预,观察 BALF 中炎症细胞的分布及肺组织病理学变化,检测血清 IgE, IL-4, IL-5 水平,且运用 $^1\text{H-NMR}$ 技术探究 TXJF 对哮喘模型大鼠血清代谢物的影响。

本研究结果显示,与正常组比较,哮喘模型组 BALF 中白细胞总数及其炎症细胞百分比,血清 IgE, IL-4, IL-5 质量浓度增高,且肺组织病理切片显示支气管壁及血管周围有大量的淋巴细胞和嗜酸性粒细胞渗出浸润,支气管黏膜皱壁增多,有黏膜脱落现象,管腔狭窄痉挛,融合成肺大泡。以上符合哮喘的病理学改变及气道炎症 Eos, IgE, IL-4, IL-5 水平增高的特征,说明哮喘模型建立成功。与模型组相比,各 TXJF 组 BALF 中白细胞总数及炎症细胞百分比明显下降,肺组织病理学改变情况较哮喘模型组明显减轻, TXJF 高、中剂量组大鼠血清中 IgE, IL-4, IL-

5 水平明显低于哮喘模型组,推测 TXJF 能够改善肺组织的病理学改变,减轻气道炎症。OPLS-DA 两两比较结果表明,哮喘模型组与 TXJF 各剂量组、正常组轮廓区域明显分开,最终筛选并鉴定出 15 种具有统计学意义的差异性代谢物,包括 VLDL 和乳酸、丙酮、亮氨酸等。

从各代谢产物的生物学功能来看,亮氨酸是支链氨基酸(BCAA)之一,为人体必需氨基酸,参与蛋白质的合成与分解^[13],能检测出机体蛋白质代谢状况,且能够增强机体免疫防护作用^[14],在肌肉和能量代谢中起着重要功能。与正常组相比,哮喘模型组中亮氨酸含量明显降低,表明哮喘大鼠体内发生合成代谢障碍,哮喘病可能使大鼠机体长期处在持续的耗能状态,从而导致亮氨酸的减少。高剂量 TXJF 干预后亮氨酸含量明显升高,表明 TXJF 通过影响蛋白质代谢起到了减轻消耗的作用。甘氨酸能防治组织损伤,增强抗氧化能力,提高机体免疫力,促进蛋白质的合成,可治疗代谢紊乱的各种炎症性疾病、癌症、糖尿病及缺血再灌注损伤等^[15-16],模型组

血清中甘氨酸比正常组含量明显降低,而TXJF干预后甘氨酸水平偏于正常化,表示TXJF可能通过调节机体内的甘氨酸,从而发挥抗炎保护作用。乳酸是糖酵解过程的终产物,在炎症、严重贫血、吞噬细胞侵入、循环障碍、呼吸障碍、肝或肾等组织的局部损伤或缺氧时,由于血管明显扩张,血管内皮受损,大量的液体从血管内渗出到组织间隙,产生局部供血不足和缺氧,导致机体糖酵解加速^[17-18],体内能量不足,致使机体长期处于耗能状态。哮喘大鼠血清中乳酸含量比正常组升高。其与糖代谢、脂类代谢、蛋白质代谢及细胞内的能量代谢关系密切。缺氧是引起乳酸增加的重要原因^[19],乳酸含量的增加,说明体内进行无氧糖酵解量增加^[20]。乳酸含量增加可能与机体存在能量代谢障碍和氧化损伤有关。TXJF干预后明显下降,提示TXJF可改善哮喘大鼠的能量代谢,减轻氧化损伤。本实验结果表明,模型组大鼠血清中脂类物质比正常组明显升高,而各TXJF组大鼠血清中脂类物质又比模型组明显降低,推测TXJF能够促进机体的脂类代谢途径,进而改善机体能量缺乏的状态,TXJF通过改善脂肪代谢途径而增强三羧酸循环、调节机体免疫功能、改善能量代谢等多种途径来实现其预防及治疗作用,其中以TXJF高、中剂量的作用较为明显,但其中的作用机制还需更进一步的研究。

哮喘的发生以体内能量代谢、氨基酸代谢及脂类代谢的紊乱为主,使整个机体机能处于一种失衡状态。本研究结果表明代谢表征的变动不仅能反映出哮喘大鼠体内发生的病理生理变化,而且在一定程度上能反映TXJF干预后出现的明显回调情况,这一结果与TXJF能够改善肺组织病理学状态、减轻气道炎症效果一致。提示TXJF能减轻气道炎症、改善肺组织病理变化,还能影响哮喘大鼠体内的能量代谢、脂肪代谢及氨基酸代谢等重要途径。

[参考文献]

[1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔医药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:312-313.

[2] 吴彩霞,张勇,顾雪竹,等. 铁线蕨化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国医药导报,2014,46(2):39-40.

[3] YUAN Q, ZHANG X, LIU Z, et al. Ethanol extract of *Adiantum capillus-veneris* L. suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B activation [J]. J Ethnopharmacol,2013,147(3):603-611.

[4] Guha P, Mukhopadhyay R, Gupta K, et al. Antifungal activity of the crude extracts and extracted phenols from

gametophytes and sporophytes of two species of *Adiantum* [J]. Taiwania,2005,50(4):272-283.

[5] Ibraheim Z Z, Ahmed A S, Gouda Y G, et al. Phytochemical and biological studies of *Adiantum capillus-veneris* L. [J]. Saudi Pharm J,2011,19(2):65-74.

[6] Singh M, Singh N, Khare P B, et al. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine [J]. J Ethnopharmacol,2008,115(2):327-329.

[7] Kasabri V, Al-Hallaq E K, Bustanji Y K, et al. Antiobesity and antihyperglycaemic effects of *Adiantum capillus-veneris* extracts; *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. Pharm Biol,2017,55(1):164-172.

[8] 阿迪拉木·阿依甫江,麦合苏木·艾克木,古孜力努尔·依马木,等. 维药铁线蕨总黄酮抗炎平喘作用研究[J]. 新疆医科大学学报,2016,39(1):17-20.

[9] 郭慧,崔扬,王秋红,等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(1):213-219.

[10] Taheri S, Aliannejad R, Rezaei-Tavirani M, et al. The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis [J]. Biomarkers, 2015, 20(1):5-16.

[11] Saude E J, Obiefuna I P, Somorjai R L, et al. Metabolomic biomarkers in a model of asthma exacerbation:urine nuclear magnetic resonance [J]. Am J Respir Crit Care Med,2009,179(1):25-34.

[12] 阿迪拉木·阿依甫江. 维药铁线蕨总黄酮的提取、纯化及药效学研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2016.

[13] 顾军,李宁,吴国豪,等. 支链氨基酸对创伤后代谢影响的研究[J]. 肠外与肠内营养,2004,11(2):93-96.

[14] 张晟,管向东,吴泽宇,等. 富含支链氨基酸的肠外营养液在外科危重病人中的应用[J]. 中国实用外科杂志,2005,25(5):299-300.

[15] WANG W W, WU Z L, DAI Z L, et al. Glycine metabolism in animals and humans; implications for nutrition and health [J]. Amino Acids,2013,45(3):463-477.

[16] 赵洪伟,刘树民,张宁,等. 玄参对脾虚水湿不化大鼠模型的影响及其肝脏代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):82-89.

[17] 江来,万小健,卞金俊,等. 重症胰腺炎大鼠血液的核磁共振谱代谢组学研究[J]. 上海医学,2009,32(11):999-1002.

[18] 车文体,李丽萍,眭维国,等. 肾移植前后患者血清中代谢物的动态研究[J]. 国际移植与血液净化杂志,2012,10(5):12-18.

[19] 张红栓. 基于代谢组学的冠心病心绞痛痰浊证、血瘀证研究[D]. 广州:南方医科大学,2010.

[20] 彭秋平,梁后杰. 糖酵解代谢在恶性肿瘤细胞中的特异性表型及其意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2009,14(5):470-473.

[责任编辑 刘德文]