

基于粪便代谢物组学分析麻黄细辛附子汤干预 H1N1 流感病毒感染小鼠的作用机制

李灿, 孙启慧, 付业佩, 巩丽丽, 杨勇, 蒋海强, 容蓉*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:运用代谢组学方法研究麻黄细辛附子汤(Mahuang Xixin Fuzi Tang, MXF)干预 H1N1 流感病毒感染小鼠粪便样品中内源性物质的变化,寻找与疾病相关的生物标志物,探讨 MXF 干预 H1N1 流感病毒感染可能的作用机制。方法:将 30 只 KM 小鼠随机等分为空白组、模型组和 MXF 组,小鼠滴鼻感染 H1N1 流感病毒后灌服 MXF(给药剂量 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),模型组和空白组灌服等量水,连续给药 7 d 并测量各组小鼠的体重和肛温,收集各组小鼠的粪便。采用 Halo C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$),流动相 0.05% 甲酸水溶液-0.05% 甲酸乙腈溶液梯度洗脱,质谱扫描范围 m/z 80 ~ 1 200,对粪便样品进行 LC-MS 测定并结合主成分分析和偏最小二乘判别分析寻找潜在生物标志物。结果:空白组、模型组和 MXF 组代谢模式显著不同,鉴定出了 9 个潜在生物标志物,分别为磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、吡哆醛、草酰乙酸、琥珀酸、褪黑素和 *L*-犬尿氨酸。结论:MXF 干预 H1N1 流感病毒感染的机制可能与其对色氨酸代谢、维生素 B6 代谢、甘油磷脂代谢和三羧酸循环等代谢紊乱的回调作用有一定相关性。

[关键词] 麻黄细辛附子汤; 代谢组学; 粪便; H1N1 流感病毒; 维生素 B6; 生物标志物; 色氨酸

[中图分类号] R969.1; R945; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0074-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170214.1034.036.html>

[网络出版时间] 2017-02-14 10:34

Mechanism Analysis of Mice Model with H1N1 Influenza Virus Intervened by Mahuang Xixin Fuzi Tang Based on Fecal Metabolomics

LI Can, SUN Qi-hui, FU Ye-pei, GONG Li-li, YANG Yong, JIANG Hai-qiang, RONG Rong*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the endogenous metabolite changes in the fecal supernatant of mice infected with H1N1 influenza virus and intervened by Mahuang Xixin Fuzi Tang (MXF), and to explore the therapeutic mechanism of MXF through metabolomics technology. **Method:** KM mice were randomly divided into blank group, model group and MXF group, model mice were intranasally inoculated with H1N1 influenza virus, and then intervened by MXF (dose of $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) through orally administration. All drug treatments were administered daily for consecutive 7 days, body weight and rectal temperature were measured, the feces were collected. Ultra performance liquid chromatography coupled to Q-exactive high resolution mass spectrometry analysis was performed on a Halo C_{18} column ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$) with 0.05% formic acid in water and 0.05% formic acid in acetonitrile for gradient elution as mobile phase and the mass spectral scanning range of m/z 80-1 200. LC-MS data were processed with principal components analysis (PCA) and partial least squares

[收稿日期] 20161208(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273626);国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09509001-001);山东省重点研发计划项目(2016YJS08A01-5)

[第一作者] 李灿,在读硕士,从事中药及复方活性成分与质量控制研究, Tel:18363080749, E-mail:licanhk@163.com

[通讯作者] *容蓉,教授,博士,从事中药及复方活性成分与质量控制研究, Tel:13869196006, E-mail:rosierrong@163.com

discriminant analysis (PLS-DA) to find out potential biomarkers. **Result:** Significant differences were found in the metabolic profiles among the blank group, model group and MXF group. Nine metabolites were identified as potential biomarkers, such as phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, *L*-kynurenine, oxalacetic acid, pyridoxal, succinic acid and melatonin. **Conclusion:** The flu induced by H1N1 virus may interfere with the tyrophan, vitamin B6, glycerol phospholipids and tricarboxylic acid cycle metabolic pathway according to these identified biomarkers. MXF may play a therapeutic role in a way of regulating the above disordered metabolic pathways.

[**Key words**] Mahuang Xixin Fuzi Tang; metabolomics; feces; H1N1 influenza virus; vitamin B6; biomarkers; tryptophan

H1N1 流感病毒感染是一种急性呼吸道传染病,临床上主要表现为头痛、发热、发冷、流鼻涕、呕吐、腹泻等症状^[1]。目前金刚烷胺、利巴韦林等西药是治疗流感的常用药^[2],但机体易出现耐药性,并可出现贫血、乏力、过敏性休克等副作用。针对西药治疗存在的种种问题,目前人们更加关注毒副作用小、价格低廉的中医治疗方法。麻黄细辛附子汤始载于《伤寒论》^[3],具有助阳解表、温经散寒之功效,用于治疗素体阳虚、复感寒邪、恶寒发热、寒重热轻等证。研究报道发现麻黄细辛附子汤能提高小鼠免疫能力,在流感病毒感染初期激活机体防御系统^[4-5];课题组前期研究发现该复方用于肾阳虚外感小鼠的治疗,可调控炎症因子、降低肺指数及肺部病毒载量,进而减少小鼠死亡率^[6-7]。

肠道微生物的生态环境和功能活动受到宿主体体状态的影响,亦会影响宿主的代谢表型;粪便代谢物作为肠道菌与宿主共代谢的产物,可以反映宿主体体以及肠道菌的状态^[8-9],因此粪便代谢组学分析正在获得越来越多的关注^[8]。本实验以 H1N1 流感病毒感染小鼠为研究对象,采用代谢组学的方法对模型小鼠粪便代谢物进行整体性动态研究,分析 H1N1 感染小鼠粪便代谢物中潜在的生物标志物,探讨麻黄细辛附子汤干预 H1N1 流感病毒感染小鼠的作用机制。

1 材料

UltiMate 3000 型液相色谱系统, Q-Exactive 型高分辨率质谱和 D-37520 Osterode 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司); DW-HL668 型超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司), DXL-XS 型小鼠代谢笼(210 mm × 205 mm × 320 mm, 苏州市冯氏实验动物设备有限公司), 01193-YP601N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), NJ 08818 型涡旋仪(美国 SI 仪器公司)。

流感病毒 H1N1(北京地方株引自中国 CDC 病

毒病研究所),麻黄、炮附子、细辛(购自济南市建联中药有限公司中药饮片厂,批号均为 20110501,经山东中医药大学李峰教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版相关项下要求),水为屈臣氏纯净水,试剂均为色谱纯。

SPF 级雄性 KM 小鼠,体重(20 ± 2) g,由山东鲁抗动物实验中心提供,合格证号 SCXK(鲁)2008-0002,经山东中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 2015-013。

2 方法与结果

2.1 麻黄细辛附子汤提取液的制备^[7] 精密称取麻黄 30 g,细辛 15 g 和附子 45 g,混合后加 8 倍量水浸泡 30 min,煎煮 30 min,滤液另器保存;残渣加 6 倍量水煎煮 20 min,滤过,合并滤液,减压浓缩至一定体积。

2.2 动物试验 30 只昆明种雄性小鼠适应性喂养 2 d,随机分为空白组、模型组、麻黄细辛附子汤组,每组 10 只。流感病毒 H1N1 鸡胚尿囊液(血凝滴度 1:320)滴鼻感染小鼠(剂量 50 μL/只),空白组小鼠滴鼻接种等量生理盐水,第 1 天接种流感病毒,第 2~7 天麻黄细辛附子汤干预治疗。小鼠灌胃剂量 20 mL·kg⁻¹,麻黄细辛附子汤剂量 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹(相当于人临床等效剂量)。模型组小鼠模型建立 24 h 后给药干预,给药组以 10 mL·kg⁻¹灌服麻黄细辛附子汤,其余各组灌服同体积水,连续给药 6 d,每天灌胃 1 次。收集给药后 12 h 粪便样品,置 -80 °C 环境保存。造模过程中每天测量空白组、模型组和麻黄细辛附子汤组小鼠的体重和肛温,每天 1 次,记录变化趋势并在试验结束后称取各组小鼠肺、肾、脾等脏器质量,计算脏器指数。

2.3 样品处理 取冷冻保存的小鼠粪便样品,室温解冻,称取约 100 mg 于 2 mL 离心管中,精密加入甲醇 500 μL,涡旋 5 min,离心(13 000 r·min⁻¹,下同) 10 min,取上清液另器存储;在粪便沉淀物中加入甲

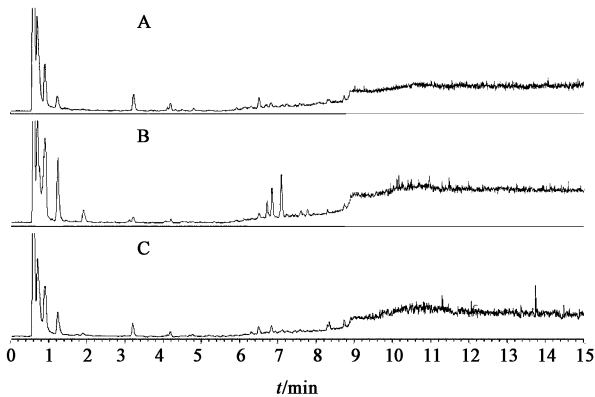
醇 500 μL , 涡旋 5 min, 离心 10 min, 合并上清液, 混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

2.4 检测分析

2.4.1 色谱条件 采用 Halo C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 2.7 μm), 流速 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$, 进样室温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 0.05% 甲酸水溶液 (A) - 0.05% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 0.5 min, 5% B; 0.5 ~ 4 min, 5% ~ 20% B; 4 ~ 8 min, 20% ~ 100% B; 8 ~ 15 min, 100% B; 15 ~ 16 min, 100% ~ 5% B; 16 ~ 20 min, 5% B)。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描检测, 鞘气流速 45 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 喷雾电压 3.0 kV, 辅助气流速 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气耐热温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 半峰宽 (full width at half maximum, FWHM) 0.7 (m/z 200), 扫描方式全扫描, 质量扫描范围 m/z 80 ~ 1 200。

2.4.3 样品测定 取空白组、模型组、麻黄细辛附子汤组的粪便供试品溶液适量, 按上述条件进行 LC-MS 测定, 总离子流图见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 麻黄细辛附子汤组

图 1 不同组别小鼠粪便样品 LC-MS 分析的 TIC

Fig. 1 TIC of mouse feces samples in different group by LC-MS

2.4.4 数据处理 空白组、模型组和麻黄细辛附子汤组的体重、肛温、脏器指数等数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析中最小显著性差异法检

验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。将格式为 *.raw 的 HPLC-MS 原始数据经 MS Convert v3.0 软件转为 *.mzXML 格式, 利用 R 语言软件 (新西兰奥克兰大学, v3.2.2) 进行色谱峰识别、对齐和校正 [质量轴偏差 = 10 ppm, 阈值 = 20, 峰宽 = C(10, 45)], 利用 SIMCA-P 11.5 软件包进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (partial least square-discriminant analysis, PLS-DA), 将多维数据进行降维处理, 得到变量投影重要性 (variable importance in the projection, VIP) > 1 的内源性代谢物信息, 将得到的数据导入 MassHunter profiler professional 12.0 软件进行 Anova 和 Fold Change (倍数变化) 等统计分析, 将得到的具有统计学意义 ($P < 0.05$, Fold Change ≥ 1.2) 的内源性代谢物数据输入 METLIN (<http://www.metlin.scripps.edu>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 等数据库进行生物标志物检索和鉴定, 得潜在生物标志物, 使用 MetPA 数据库进行代谢道路分析。

2.5 麻黄细辛附子汤干预 H1N1 感染小鼠的药理作用分析 空白组小鼠皮毛光滑干爽, 精神状态良好, 总体呈上升趋势, 无死亡现象。接种流感病毒后, 模型组小鼠初期出现打喷嚏、厌食、精神萎靡不振等症状, 第 4 天起, 体重与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 并在第 5 天降至最低 ($P < 0.01$), 随后体重呈小幅度上升趋势。与空白组相比, 模型组小鼠肛温降低, 并在第 2 天起有显著性差异; 肺指数明显升高 ($P < 0.01$), 胸腺指数、脾指数呈现降低趋势; 总体死亡率 10%。麻黄细辛附子汤干预后, 与模型组相比, 小鼠体重从第 3 天起呈回升趋势; 肛温略有回升; 肺指数下降, 胸腺指数和脾指数增高。说明麻黄细辛附子汤可改善模型小鼠的体征, 降低肺部感染程度, 减轻对胸腺、脾脏等免疫组织的影响, 降低 H1N1 感染小鼠的死亡率。见表 1 ~ 3。

表 1 麻黄细辛附子汤 (MXF) 对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Mahuang Xixin Fuzi Tang (MXF) on body weight of mice in 7 days ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白	24.2 \pm 1.2	25.7 \pm 1.7	26.4 \pm 1.2	28.2 \pm 2.1	29.1 \pm 1.4	29.3 \pm 2.2	27.7 \pm 2.5
模型	25.1 \pm 1.0	24.8 \pm 2.0	24.8 \pm 1.3	24.1 \pm 1.4 ¹⁾	23.0 \pm 2.1 ²⁾	23.3 \pm 2.2 ²⁾	24.4 \pm 2.5 ¹⁾
MXF	23.6 \pm 1.7	22.6 \pm 2.6	23.0 \pm 2.5	23.8 \pm 1.9 ¹⁾	24.1 \pm 2.3 ²⁾	24.1 \pm 1.9 ²⁾	24.9 \pm 2.4 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

表 2 麻黄细辛附子汤对小鼠肛温的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Changes of rectal temperature of mice treated by MXF in 7 days ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
空白	36.5 ± 0.4	36.7 ± 0.5	37.1 ± 0.3	36.5 ± 0.4	36.9 ± 0.2	36.4 ± 0.6	36.3 ± 0.4
模型	36.6 ± 0.6	35.6 ± 0.8 ¹⁾	35.8 ± 0.6 ¹⁾	35.3 ± 1.2 ¹⁾	35.4 ± 1.1 ¹⁾	34.7 ± 1.0 ²⁾	35.2 ± 1.1 ¹⁾
MXF	36.6 ± 0.5	35.7 ± 0.8 ¹⁾	35.6 ± 0.9 ¹⁾	35.4 ± 1.4 ¹⁾	35.5 ± 1.3 ¹⁾	35.2 ± 1.1 ¹⁾	35.5 ± 0.9 ¹⁾

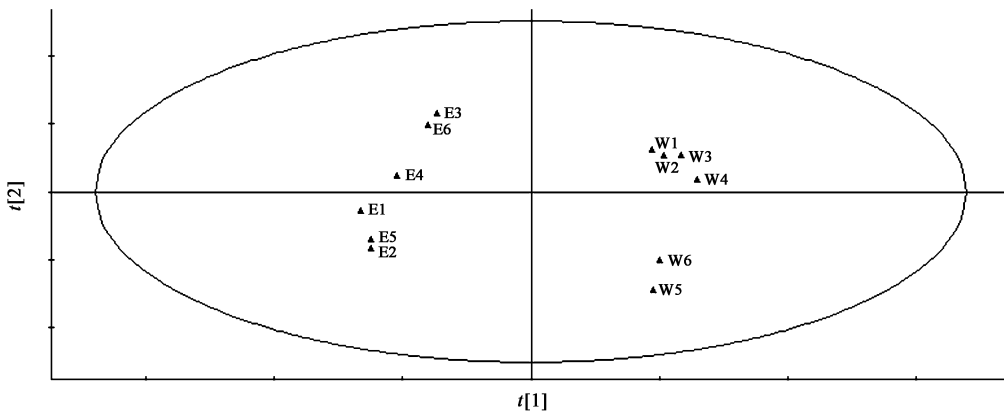
表 3 麻黄细辛附子汤对小鼠脏器指数和死亡率的影响 ($n = 10$)

Table 3 Influence of MXF on lung index, mortality rate of mice ($n = 10$)

组别	肺指数 ($\bar{x} \pm s$)	胸腺指数 ($\bar{x} \pm s$)	脾指数 ($\bar{x} \pm s$)	死亡率 /%
空白	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0
模型	1.0 ± 0.2 ²⁾	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	10
MXF	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0

2.6 粪便样本代谢物谱分析 在质控样本中提取 5 个离子色谱峰 (m/z 116.07, 363.31, 502.32,

768.46, 923.50) 的峰面积和保留时间进行方法学考察。每隔 6 个样本加 1 个质控样品, 以峰面积和保留时间为指标计算 RSD, 考察仪器的稳定性。结果表明质控样品峰面积 RSD 1.2% ~ 3.1%, 保留时间 RSD 在 0.4% ~ 2.3%。采集粪便样品代谢物谱数据, 将空白组、模型组第 7 天的代谢物谱降维处理, 得 PCA 得分图, 见图 2。结果发现 ($R^2 = 0.866$, 模型预测能力 $Q^2 = 0.759$) 空白组、模型组组内聚集, 组间分散, 说明空白组与模型组的粪便代谢物谱差异显著。



E. 空白组; W. 模型组

图 2 麻黄细辛附子汤干预外感小鼠的 PCA 得分

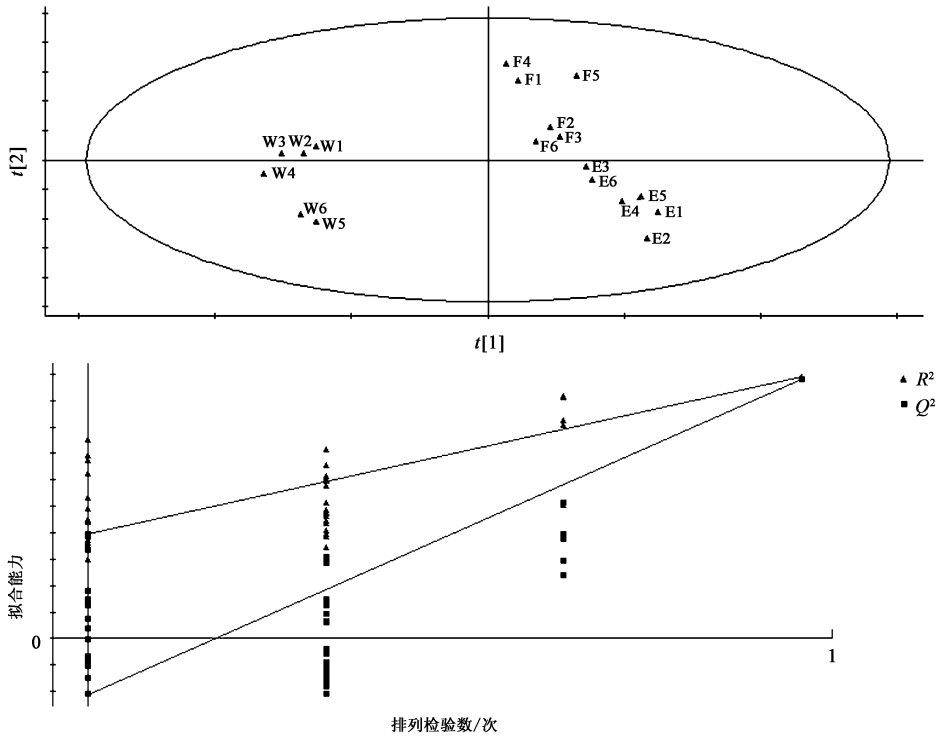
Fig. 2 PCA score of exogenous mice invented by MXF

为了去除外界不可控因素对代谢物产生的影响, 进一步采用有监督的 PLS-DA 分析, 见图 3。结果显示 (模型拟合能力 $R^2Y = 0.888$, $Q^2 = 0.88$) 空白组、模型组、麻黄细辛附子汤组明显分开, 且麻黄细辛附子汤组更靠近空白组, 说明麻黄细辛附子汤对 H1N1 流感小鼠有一定的干预作用。为了判定模型的有效性, 对 3 组的代谢物谱数据进行排列检验 ($R^2 = 0.516$, $Q^2 = -0.245$), 见图 3。结果显示 2 条回归曲线斜率不同, 左端 R^2 和 Q^2 的数值均小于右端, 且最右端的 R^2 和 Q^2 的数值差较小, 说明原始模型相较于任何 1 次随机排列 Y 变量的预测能力较好, 证明模型建模成功, 可进行下一步分析。

2.7 潜在生物标志物的鉴定分析 VIP 是变量对

分类的贡献程度, 筛选 VIP > 1 且具有统计学意义的变量为潜在生物标志物。将潜在的生物标志物输入 METLIN, HMDB, KEGG 数据库进行检索并确认, 得到了 9 种潜在生物标志物, 见表 4。

2.8 代谢途径分析 MetPA (<http://metpa.metabolomics.ca>) 数据库功能全面、易于使用, 是基于网络的代谢网络通路分析, 其将通路富集分析和拓扑分析方法结合起来, 有助于研究者确定最为可信的代谢通路^[10]。将表 4 中鉴定出的标志物输入 MetPA 分析平台, 构建代谢通路。结果显示上述生物标志物涉及的主要代谢通路有三羧酸循环、色氨酸代谢、甘油磷脂代谢、维生素 B6 代谢。通过对代谢通路的分析, 发现这些代谢通路与能量代谢密切



E. 空白组; W. 模型组; F. 麻黄细辛附子汤组

图 3 麻黄细辛附子汤干预外感小鼠的 PLS-DA 得分(上)得分和排列检验(下)

Fig. 3 PLS-DA (upper) score and alignment test (lower) of exogenous mice invented by MXF

表 4 H1N1 感染小鼠的潜在生物标志物

Table 4 Potential biomarkers of mice infected by H1N1

No.	t_R /min	m/z	分子式	生物标志物	KEGG ID	VIP	代谢通路	趋势	
								模型组	MXF 组
1	7.31	760.12	$C_{43}H_{86}NO_8$	磷脂酰乙醇胺	C00350	1.93	甘油磷脂代谢	↑	↓
2	6.90	735.97	$C_{38}H_{70}NO_8$	磷脂酰丝氨酸	C02737	1.67	甘油磷脂代谢	↑	↓
3	7.39	890.26	$C_{52}H_{92}NO_8P$	磷脂酰胆碱	C00157	2.11	甘油磷脂代谢	↓	↑
4	7.16	541.66	$C_{28}H_{48}NO_7P$	溶血磷脂酰胆碱	C04230	1.92	甘油磷脂代谢	↓	↑
5	0.62	169.12	$C_8H_{11}NO_3$	吡哆醛	C00314	1.20	维生素 B6 代谢	↓	↑
6	6.59	118.09	$C_4H_4O_5$	草酰乙酸	C00365	1.93	三羧酸循环	↑	↓
7	0.59	108.12	$C_4H_6O_4$	琥珀酸	C00042	1.39	三羧酸循环	↓	↑
8	3.81	208.21	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	L-犬尿氨酸	C00328	1.55	色氨酸代谢	↑	↓
9	3.30	232.28	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	褪黑素	C01598	1.25	色氨酸代谢	↓	↑

相关,并构建了代谢网络通路图,见图 4。

3 讨论

模型组中,L-犬尿氨酸升高、褪黑素降低,显示色氨酸代谢异常;吡哆醛水平降低,显示维生素 B6 代谢异常。麻黄细辛附子汤给药后,以上标志物含量向正常水平回调。研究发现机体处于应急状态时,会激活吡哆胺-2,3-双加氧酶 1 活性^[11],催化色氨酸产生 L-犬尿氨酸,使之含量增高;色氨酸代谢异常,会进而引起褪黑素降低。褪黑素和 B 族维生

素是促进肠道有益菌增殖、维护肠道菌群平衡的重要物质^[11-13],并与体液免疫和细胞免疫有关^[13-14]。因此,认为 H1N1 病毒感染会影响色氨酸代谢和维生素 B6 代谢,在一定程度上引起肠道菌群的紊乱、降低机体免疫力;麻黄细辛附子汤对色氨酸代谢和维生素 B6 代谢异常具有一定干预作用,有利于菌群平衡和免疫力的恢复。

本文从粪便代谢物中筛选出磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰胆碱 4 个与

