

· 药物代谢 ·

基于靶向脂质组学探究开玄补肾法对寻常型银屑病的干预机制

代丹¹, 陈艳华², 何春燕³, 王烁¹, 宋坪^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053;

2. 中央民族大学, 北京 100081; 3. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] 目的:通过靶向脂质组学技术,从脂代谢角度探究开玄补肾法对寻常型银屑病的干预机制,为寻常型银屑病的诊断和治疗提供参考。方法:选取2019年9月至2020年11月中国中医科学院广安门医院皮肤科门诊收治的26例寻常型银屑病患者作为研究对象(观察组),同期在该院预防保健科招募健康志愿者26例作为对照组,入组时予对照组及观察组采取静脉血以进行血脂指标和靶向脂质组学检测。观察组予开玄补肾法治疗,连续治疗12周后,比较治疗前后患者银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)以评估疗效,同时再次静脉抽血检测以比较治疗前后患者血脂水平和脂质代谢情况。靶向脂质组学分析采用超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS),色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-水(6:4,含5 mmol·L⁻¹甲酸铵,A)和乙腈-异丙醇(1:9,含5 mmol·L⁻¹甲酸铵,B)梯度洗脱,流速0.26 mL·min⁻¹;质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,扫描范围 m/z 50~1 200。建立主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)模型筛选差异代谢物,鉴定差异代谢物并进行相关通路分析。结果:经开玄补肾法治疗12周后,26例寻常型银屑病患者中PASI评分的下降率达50%以上的有22人,总有效率84.62%。寻常型银屑病患者血清中甘油三酯含量明显高于健康人($P<0.05$),经治疗后,甘油三酯水平明显降低($P<0.05$)。靶向脂质组学分析共筛选出寻常型银屑病潜在生物标志物43个,其中42个上调、1个下调,涉及亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢等7条信号通路;开玄补肾法对寻常型银屑病疗效的潜在生物标志物14个,其中6个上调、8个下调,涉及鞘脂代谢、亚油酸代谢和甘油磷脂代谢等5条信号通路;在健康人和寻常型银屑病患者、寻常型银屑病患者治疗前后的对比中,得到共同差异代谢物磷脂酰胆碱(PC)38:0和神经酰胺(Cer)42:1,共同的信号通路是亚油酸和甘油磷脂代谢通路。结论:寻常型银屑病脂质代谢紊乱主要涉及鞘脂、甘油磷脂和亚油酸代谢通路,开玄补肾法可以对其中的亚油酸和甘油磷脂代谢通路进行调节,从而改善银屑病皮损。

[关键词] 靶向脂质组学; 寻常型银屑病; 开玄补肾法; 生物标志物; 亚油酸代谢; 甘油磷脂代谢

[中图分类号] R22;R24;R969.1;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0117-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220749 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.0925.002.html>

[网络出版日期] 2022-07-19 16:37:28

Targeted Lipidomics Reveals Lipid Modulation of Kaixuan Bushen Method on Psoriasis Vulgaris

DAI Dan¹, CHEN Yanhua², HE Chunyan³, WANG Shuo¹, SONG Ping^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

2. Minzu University of China, Beijing 100081, China;

3. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** Through the targeted lipidomics, we explored the intervention mechanism of Kaixuan Bushen method on psoriasis vulgaris (PV) from the perspective of lipid metabolism, providing

[收稿日期] 2022-04-01

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A02301);国家自然科学基金项目(82074448)

[第一作者] 代丹,在读博士,从事中医药防治皮肤病的机制研究,E-mail:13051526928@163.com

[通信作者] *宋坪,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治皮肤病研究,E-mail:songping@vip.126.com

reference for the diagnosis and treatment of PV. **Method:** Twenty-six patients with PV admitting the outpatient clinic of the Department of Dermatology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences from September 2019 to November 2020 were selected as the research object (observation group), and 26 sex- and age-matched healthy volunteers in the same period were recruited as control group. Venous blood was collected for lipid index and targeted lipidomics detection in the control and observation groups at inclusion. After 12 weeks of continuous treatment of Kaixuan Bushen method, the psoriasis area and severity index (PASI) was measured and compared before and after treatment to assess the clinical efficacy, while venous blood was collected again in the observation group to compare the blood lipid level and lipid metabolism of patients before and after treatment. Targeted lipidomics analysis was performed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) on an ACQUITY UPLC BEH C₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with mobile phase of 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in acetonitrile-water (6:4, A)-5 mmol·L⁻¹ ammonium formate in acetonitrile-isopropanol (1:9, B) for gradient elution and flow rate of 0.26 mL·min⁻¹. Conditions of MS were electrospray ionization (ESI), positive and negative ion modes, and scanning range of *m/z* 50-1 200. Then principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) models were developed to screen differential metabolites, and the differential metabolites were identified and the pathways were enriched. **Result:** After 12 weeks of treatment with Kaixuan Bushen method, PASI score decreased by more than 50% in a total of 22 out of 26 patients with PV, suggesting the total effective rate was 84.62%. The serum triglyceride level of patients with PV was significantly higher than that of healthy individuals (*P*<0.05), and the triglyceride level was significantly reduced after treatment (*P*<0.05). Targeted lipidomics analysis screened a total of 43 potential biomarkers for PV, of which 42 were up-regulated and 1 was down-regulated, involving 7 signaling pathways such as linoleic acid metabolism, glycerophospholipid metabolism and unsaturated fatty acid biosynthesis. Moreover, there were 14 response makers for clinical efficacy of Kaixuan Bushen method on PV, of which 6 were up-regulated and 8 were down-regulated, involving five signaling pathways such as linoleic acid metabolism, glycerophospholipid metabolism and sphingolipids metabolism. In a comparison between healthy individuals and patients with PV and PV before and after treatment, the common differential metabolites were screened as phosphatidylcholine (PC) 38:0 and ceramide (Cer) 42:1, and the common pathways were linoleic acid and glycerophospholipid metabolic pathways. **Conclusion:** The disorder of lipid metabolism in PV are largely due to abnormal sphingolipid, glycerophospholipid and linoleic acid metabolic pathways, of which Kaixuan Bushen method can regulate the glycerophospholipid and linoleic acid metabolism, thereby improving psoriatic lesions.

[Keywords] targeted lipidomics; psoriasis vulgaris; Kaixuan Bushen method; biomarkers; linoleic acid metabolism; glycerophospholipid metabolism

银屑病是皮肤科常见的慢性炎症性疾病,临床上一般可分为寻常型、关节病型、脓疱型和红皮型,其中寻常型银屑病占总发病人数的90%以上^[1]。寻常型银屑病的发生受遗传、病毒感染、免疫紊乱及代谢障碍等多种因素影响,但其具体病理机制尚有待进一步探索^[2]。最新研究显示,寻常型银屑病与肥胖、糖尿病、心血管疾病等代谢疾病有相同的易感基因、炎症信号通路及脂质代谢异常,随着病情进展常合并发生^[3-4],给患者造成了较大的经济及心理压力。中医治疗寻常型银屑病临床反馈良好且安全性较高^[5-6]。本课题组结合名老中医经验及多

年临证体会,不囿于寻常型银屑病多属血热、血瘀、血虚的传统中医病机认识^[6],从“玄府理论”视角论治寻常型银屑病,认为其核心病机为“玄府闭郁、肾精亏损”,并提出应用“开玄解毒、补肾培元”法(以下简称“开玄补肾法”)治疗^[7]。与常用的活血解毒法比较,临床观察及动物实验均提示开玄补肾法在改善银屑病皮损方面更具优势^[8-9],且对寻常型银屑病患者合并的血脂紊乱具有显著的改善作用^[10]。

代谢组学目前在生物标志物识别、表型分子机制探索等方面已得到广泛应用^[11-12],其通过联合高通量分析、模式识别及专家系统技术,可解读个体

遗传和动态环境之间的复杂扰动^[13],对于揭示疾病病理机制、辅助临床诊疗,特别是个体化精准医疗具有重要意义^[14]。非靶向脂质组学研究显示,在寻常型银屑病患者血清中,溶血磷脂酸、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、磷脂酸水平显著增加,而磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱(PC)水平则显著降低^[15]。本课题组前期研究也表明寻常型银屑病存在脂质代谢失常,且以游离脂肪酸(FA)、PC、鞘磷脂(SM)和甘油三酯(TG)类脂质显著升高为主^[16]。此外,脂质代谢在寻常型银屑病的治疗过程中也会产生变化^[17-18],因此监测血清脂质代谢物水平对寻常型银屑病病情评估和疗效评定具有较高临床价值。基于此,本研究采用超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)进行血清靶向脂质组学分析,探索开玄补肾法干预寻常型银屑病异常脂代谢的效应靶点及可能机制,为寻常型银屑病的诊断和治疗提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC I-Class Xevo TQ-S型液质联用系统(美国Waters公司),BT25S型电子分析天平(德国Sartorius公司),Mikro 220R型高速冷冻离心机(德国Hettich公司),NA-5L型氮气/空气一体机(北京中兴分析仪器仪表新技术研究所),VX-200型漩涡混合器(美国Labnet公司),SBH130D/3型样品浓缩仪(英国Stuart公司)。

溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)16:0、LPE18:0、磷脂酰乙醇胺(PE)(16:0/16:0)、PE[18:1(9Z)/0:0]、PE[18:0/18:1(9Z)]、PE(16:0/18:1)、LPC14:0、LPC16:0、LPC18:0、LPC20:0、LPC24:0、PC(16:0/16:0)、PC(16:0/18:1)、PC(18:0/16:0)、PC(18:0/18:1)、PC(16:0/14:0)、PC(22:0/0:0)、PC(18:0/18:0)、PC(16:0/18:2)、PC(18:0/18:2)、神经酰胺(Cer)(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/22:0)、Cer(d18:1/24:0)、Cer(d18:1/14:0)、Cer(d18:1/24:1)、TG(16:1/16:1/16:1)26个脂质对照品和LPC19:0、PC(19:0/19:0)、PE(12:0/13:0)、Cer(d18:1/17:0)、SM(d18:1/12:0)、TG(15:0/15:0/15:0)6个脂质内标(美国Avanti Polar Lipids公司,批号分别为53862-35-4、69747-55-3、923-61-5、89576-29-4、6418-95-7、26662-94-2、20559-16-4、17364-16-8、19420-57-6、108341-80-6、325171-59-3、63-89-8、26853-31-6、59403-53-1、56421-10-4、69441-09-4、125146-65-8、816-94-4、159701-21-0、27098-24-4、24696-26-2、27888-44-4、102917-80-6、123408-74-2、54164-50-0、129784-33-4、108273-88-7、95416-27-6、1246304-47-1、67492-16-4、

474923-21-2、7370-46-9,纯度均>99%),FA14:0、FA14:1、FA15:1、FA16:1、FA17:1、FA18:0、FA18:1、FA18:2、FA18:3、FA19:1、FA20:1、FA20:2、FA20:4、FA22:1、FA23:0、FA24:1对照品(瑞典Larodan公司,批号分别为544-64-9、84743-29-3、373-49-9、29743-97-3、57-11-4、506-17-2、506-21-8、147527-21-7、463-40-1、60-33-3、2091-39-6、17046-59-2、112-86-7、2433-96-7、506-32-1、506-37-6,纯度均>99%),甲酸铵(美国Sigma-Aldrich公司,批号540-69-2),TG、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司,批号分别为20162400335、20172400670、20182400142、20182400144],水为超纯水,甲醇、乙腈、异丙醇、甲基叔丁基醚、甲酸为质谱纯,其他试剂均为分析纯。实验用饮片均经中国中医科学院广安门医院杨辉副主任药师鉴定,均符合相关规定。

2 方法

2.1 一般资料 选取2019年9月至2020年11月中国中医科学院广安门医院皮肤科门诊收治的26例寻常型银屑病患者作为研究对象(观察组),同期在我院预防保健科招募健康志愿者26例作为对照组。观察组男性18例,女性8例,平均年龄(36.12±11.70)岁,平均身体质量指数(23.48±2.42) kg·m²,平均病程(10.71±9.19)年,平均银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)评分(18.32±9.21)分。对照组男性18例,女性8例,平均年龄(35.42±11.28)岁,平均身体质量指数(22.96±2.43) kg·m²。两组受试者年龄、性别等一般资料差异无统计学意义,具有可比性。本研究已通过中国中医科学院广安门医院伦理委员会审批(批件号2019-060-KY),所有患者均签署知情同意书,治疗期间依从性良好,无剔除、脱落病例。

2.2 诊断标准 参照《中国临床皮肤病学》^[19]及《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[20]制订寻常型银屑病的诊断标准为典型皮损为红色丘疹、斑丘疹、斑块,多呈对称分布,上覆银白色鳞屑,刮除后可见淡红色半透明薄膜(薄膜现象),剥去薄膜可见点状出血(Auspitz征),伴有不同程度瘙痒。

2.3 纳入标准 ①符合寻常型银屑病诊断;②年龄18~65周岁,性别不限;③自愿签署知情同意书。

2.4 排除标准 ①关节病型、脓疱型或红皮型银屑病患者;②近1月内接受过西药(维A酸类、糖皮质激素类、抗肿瘤药、免疫抑制剂及生物制剂)或其他

可影响银屑病病情治疗的患者;③合并重要脏器功能障碍、精神系统疾病、恶性肿瘤及凝血功能障碍;④合并其他可能影响脂质代谢的疾病如糖尿病、高血压、高脂血症;⑤准备妊娠、妊娠期或哺乳期妇女;⑥对本研究治疗药物过敏;⑦根据研究者判断,具有降低入组可能性或使入组复杂化的其他病变或情况,如工作环境经常变动、生活环境不稳定等易造成失访的情况。

2.5 治疗方法 入组的寻常型银屑病患者在开玄补肾法主方基础上辨证加减,主方组成为羚羊角粉0.6 g^{分冲}、麻黄9 g、桂枝18 g、全蝎3 g、石膏20 g^{先煎}、黑顺片9 g^{先煎}、青蒿30 g、土茯苓30 g、淫羊藿15 g、白花蛇舌草30 g、甘草9 g^[21]。兼血瘀者,加乳香、没药活血散瘀;热毒偏盛者,加白英、蛇莓、黄芩清热解毒;皮损肥厚者,加桑枝、路路通通经活络。每日1剂,水煎,早、晚2次分服,连续服药12周。嘱患者入组期间正常饮食,保持既往生活习惯。

2.6 疗效标准 计算入组患者经过开玄补肾法治疗12周后的PASI评分下降率=(治疗前PASI评分-治疗后PASI评分)/治疗前PASI评分×100%^[22]。显效标准为PASI评分下降率>75%;有效标准为50%<PASI评分下降率≤75%;无效标准为PASI评分下降率≤50%。总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数×100%。

2.7 血脂指标检测 入组后对照组采静脉血1次、观察组于治疗前后各采取静脉血1次,进行血脂指标检测,检测指标包括TG、TC、HDL-C、LDL-C。

2.8 UPLC-MS/MS检测

2.8.1 样本采集与制备 对照组入组后采样1次,观察组治疗前后各采样1次。受试者采样前1 d清淡饮食、避免剧烈活动,采样当天晨起空腹,取舒适体位,静脉采血8 mL,4 °C恒温静置30 min,待血液凝固后离心(3 500 r·min⁻¹,4 °C,10 min,离心半径10 cm),收集上层血清,于-80 °C保存备用。分析前于4 °C冰箱缓慢解冻血清样本,用移液枪吸取血清10 μL移入1.5 mL离心管中。用甲醇配制LPC19:0、PC(19:0/19:0)、PE(12:0/13:0)、Cer(d18:1/17:0)、SM(d18:1/12:0)、TG(15:0/15:0/15:0)质量浓度分别为30、30、100、200、40、200 μg·L⁻¹的混合脂质内标溶液。依次向血清中加入内标溶液150 μL、甲基叔丁基醚溶液500 μL和超纯水125 μL,涡旋30 s,离心(13 200 r·min⁻¹,4 °C,10 min,离心半径8 cm,下同),取上清液备用。正离子检测模式下取制备样本100 μL,移入1.5 mL离心管,氮气干燥后加入

乙腈-异丙醇-水(65:30:5,下同)复溶液200 μL,涡旋30 s,离心,吸取上清液150 μL移入进样小瓶,待测;负离子检测模式下取制备样本300 μL,氮气干燥后加入乙腈-异丙醇-水复溶液100 μL,涡旋30 s,离心,取上清液50 μL移入进样小瓶,待测。

2.8.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),以含5 mmol·L⁻¹甲酸铵的乙腈-水(6:4)为流动相A,含5 mmol·L⁻¹甲酸铵的乙腈-异丙醇(1:9)为流动相B进行梯度洗脱(0~1.0 min,100%A;1.0~2.0 min,100%~70%A;2.0~12.0 min,70%~30%A;12.0~12.5 min,30%~5%A;12.5~13.0 min,5%~0%A;13.0~14.0 min,0%A),柱温55 °C,流速0.26 mL·min⁻¹,正离子模式下进样量1 μL,负离子模式下进样量2 μL。

2.8.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下采用多反应监测(MRM)模式进行信号采集,毛细管电压1 kV,锥孔电压20 V,离子源温度150 °C,去溶剂气温度400 °C,去溶剂气流量设定800 L·h⁻¹,锥孔气流量150 L·h⁻¹,扫描范围选择*m/z* 50~1 200。采用质量控制(QC)样品评价并监测仪器在分析过程中的稳定性。

2.8.4 脂质组学数据处理 将UPLC-MS/MS原始数据导入Progenesis QI 2.3进行峰识别、过滤、对齐及强度校正等操作,以优化设定参数。通过手动提取任意质量数的色谱峰,对结果的准确性进行验证,获得包括*m/z*、保留时间(*t_R*)及峰面积等信息在内的二维数据矩阵。将所有检测的脂类代谢物在各样本中的峰面积导入SIMCA-P 14.1软件进行多元统计分析,包括主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),以评估样本的分类、差异情况及模型是否过拟合。结合变量重要性投影(VIP)值>1和*t*检验*P*<0.05确定差异代谢物,差异代谢物在人类代谢组数据库(HMDB)中进行检索与确认,将相应的代谢物编号输入MetaboAnalyst 5.0在线分析平台,以京都基因与基因组百科全书(KEGG)作为背景知识库进行通路富集分析。

2.9 统计学方法 采用SPSS 25.0进行统计分析,定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,定性资料采用百分比(%)表示。配对样本*t*检验用于符合正态分布的组内比较,配对样本Kruskal-Wallis检验用于不符合正态分布的组内比较,独立样本*t*检验用于符合正态分布的组间比较,Kruskal-Wallis检验或卡方检验用于不符合正态分布的组间比较。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 临床疗效分析及各组血脂水平比较 经开玄补肾法治疗12周,显效率69.23%(18/26),有效率15.38%(4/26),无效率15.38%(4/26),即开玄补肾法治疗银屑病总有效率84.62%(22/26)。各组血脂检测结果见表1,观察组治疗前TG水平较对照组明显升高($P<0.05$),治疗后TG水平则较治疗前明显降低($P<0.05$)。

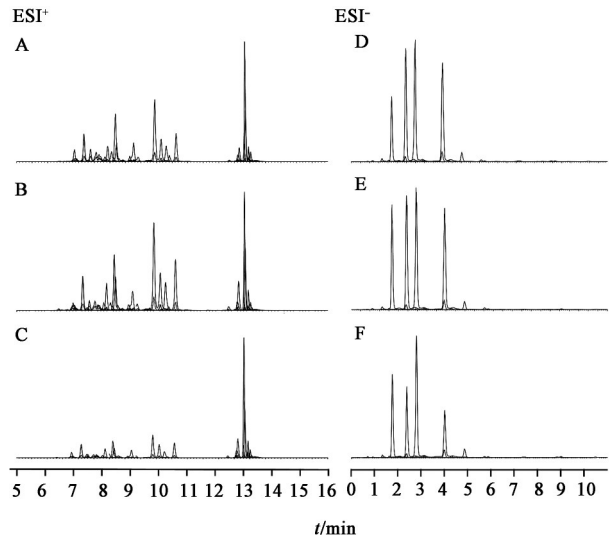
表1 开玄补肾法对寻常型银屑病患者血脂指标的影响($\bar{x}\pm s, n=26$)
Table 1 Blood lipid indexes after intervention of Kaixuan Bushen method in patients with psoriasis vulgaris ($\bar{x}\pm s, n=26$) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	阶段	TG	TC	LDL-C	HDL-C
观察组	治疗前	1.82±1.26 ¹⁾	5.01±0.87	3.11±0.78	1.26±0.27
	治疗后	1.30±0.69 ²⁾	4.76±0.79	3.01±0.63	1.27±0.25
对照组		0.96±0.29	4.65±0.71	2.82±0.54	1.38±0.27

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$;与观察组治疗前比较²⁾ $P<0.05$

3.2 各组血清代谢物的多元数据分析 共检测到170个脂质代谢物,其中正离子模式下144个,负离子模式下26个,各组血清样本总离子流图见图1。采用无监督的PCA模型可视化组间代谢物差异,见图2,QC样品分布集中[QC样本中内标化合物相对标准偏差(RSD)均 $<20\%$],说明检测过程仪器具有良好稳定性,而对照组、观察组治疗前和治疗后组间分离程度不明显。构建有监督的PLS-DA模型,对照组和观察组治疗前、观察组治疗前和观察组治疗后可明显区分开来,见图3,说明寻常型银屑病脂质代谢存在异常,开玄补肾法可影响寻常型银屑病脂质代谢。为验证PLS-DA模型的重复性和可靠性,对2个模型分别进行200次置换检验,对照组和观察组治疗前PLS-DA模型的 R^2Y (表示模型解释能力)=0.315、 Q^2 (表示模型预测能力)=-0.087;

观察组治疗前和观察组治疗后PLS-DA模型的 $R^2Y=0.295$ 、 $Q^2=-0.101$,2个模型 Q^2 均 <0 ,说明所构建模型不存在过拟合现象,均具有较好的稳定性和预测能力。



注:A,D.对照组;B,E.观察组治疗前;C,F.观察组治疗后

图1 不同离子模式下各组患者血清的UPLC-MS/MS总离子流
Fig. 1 Total ion chromatograms of serum samples from each group in different ion modes

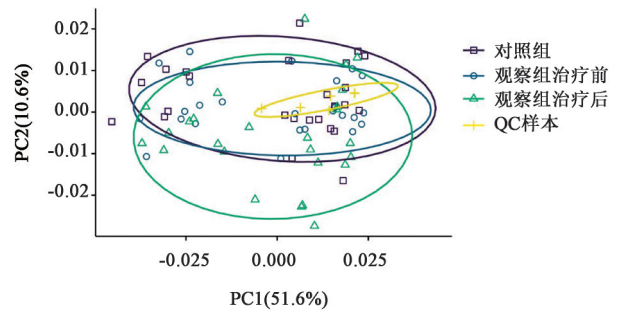


图2 开玄补肾法干预寻常型银屑病患者后脂质代谢组分变化的PCA得分

Fig. 2 PCA score of changes of lipid metabolites after intervention of Kaixuan Bushen method in patients with psoriasis vulgaris

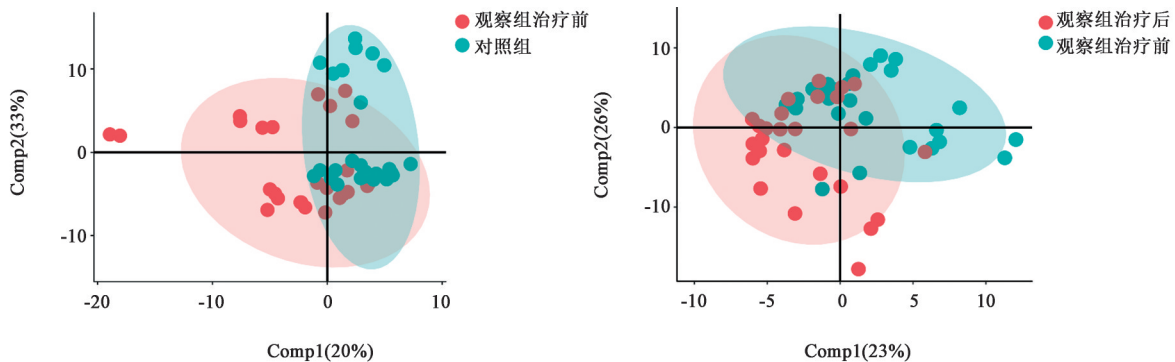


图3 开玄补肾法干预寻常型银屑病患者后脂质代谢组分变化的PLS-DA得分

Fig. 3 PLS-DA score plot of changes of serum lipid metabolic components after intervention of Kaixuan Bushen method in patients with psoriasis vulgaris

3.3 差异代谢物的筛选和鉴定 由PLS-DA模型计算代谢物的VIP值,以VIP值>1且P<0.05为标准筛选差异代谢物。通过比较对照组和观察组治疗前的脂质代谢组分水平,最终获得43个寻常型银屑病潜在生物标志物,其中42个上调、1个下调,包含Cer、FA、PC、PE和TG共5个类别脂质,见表2。通过比较观察组治疗前和治疗后的脂质代谢组分水

平,得到开玄补肾法对寻常型银屑病疗效的潜在生物标志物14个,其中6个上调、8个下调,包含Cer、FA、PC、LPC、LPE和SM共6个类别脂质,见表3。经上述组间及组内自身前后的2次比较后,发现共有差异代谢物PC38:0和Cer42:1,其在寻常型银屑病患者血清中较对照组明显升高(P<0.05),经开玄补肾法治疗12周后,表达则明显下调(P<0.05)。

表2 寻常型银屑病的潜在生物标志物信息

Table 2 Information on potential biomarkers for psoriasis vulgaris

代谢物	离子模式	前体离子 m/z	产物离子 m/z	碰撞能量/V	P	VIP值	变化趋势	代谢物	离子模式	前体离子 m/z	产物离子 m/z	碰撞能量/V	P	VIP值	变化趋势
Cer38:1-3	正	594.6	264.3	30	0.014	1.391	↑	PE36:4	正	740.5	599.5	50	0.012	1.426	↑
Cer40:1	正	622.6	264.3	30	0.034	1.286	↑	PE40:5	正	794.6	653.6	50	0.019	1.245	↑
Cer40:3	正	618.6	264.3	30	0.019	1.369	↑	TG48:1	正	822.6	549.4	20	0.005	1.560	↑
Cer42:1	正	650.6	264.3	30	0.020	1.345	↑	TG48:2	正	820.7	549.4	20	0.005	1.564	↑
Cer42:2-3	正	648.6	264.3	30	0.005	1.651	↑	TG48:3	正	818.7	547.4	20	0.001	1.791	↑
FA16:1	负	253.2	253.2	18	0.040	1.135	↑	TG50:0	正	852.6	579.4	20	0.024	1.279	↑
FA16:2	负	251.2	251.2	18	0.006	1.506	↑	TG50:1	正	850.6	577.4	20	0.009	1.433	↑
FA18:1	负	281.2	281.2	18	0.007	1.442	↑	TG50:2	正	848.6	575.4	20	0.002	1.636	↑
FA18:2	负	279.2	279.2	18	0.001	1.736	↑	TG50:3	正	846.6	575.4	20	0.003	1.637	↑
FA20:1	负	309.3	309.3	18	0.026	1.219	↑	TG50:4	正	844.6	545.4	20	0.001	1.940	↑
FA20:2	负	307.3	307.3	18	0.001	1.704	↑	TG52:2	正	876.6	575.4	20	0.009	1.427	↑
FA20:3	负	305.2	305.2	18	0.003	1.538	↑	TG52:3	正	874.6	603.4	20	0.005	1.548	↑
FA22:2	负	335.3	335.3	18	0.004	1.627	↑	TG52:4	正	872.6	573.4	20	0.001	1.715	↑
FA22:4	负	331.3	331.3	18	0.001	1.651	↑	TG52:5	正	870.6	597.4	20	0.006	1.485	↑
FA24:1	负	365.3	365.3	18	0.023	1.336	↑	TG52:6	正	868.6	597.4	20	0.005	1.606	↑
FA25:0	负	381.4	381.4	18	0.037	1.452	↓	TG54:1	正	906.6	605.4	20	0.010	1.405	↑
PC38:0	正	818.6	184.1	15	0.022	1.343	↑	TG54:2	正	904.8	631.4	20	0.004	1.557	↑
PC42:4	正	866.7	184.1	15	0.046	1.205	↑	TG54:3	正	902.6	629.4	20	0.001	1.744	↑
PE34:1	正	718.5	577.5	50	0.001	1.849	↑	TG54:4	正	900.8	629.4	20	0.001	1.812	↑
PE34:2	正	716.5	575.5	50	0.004	1.640	↑	TG54:5	正	898.6	627.4	20	0.001	1.751	↑
PE36:2-1	正	744.6	603.5	50	0.004	1.565	↑	TG54:6	正	896.6	625.4	20	0.001	1.862	↑
PE36:3-1	正	742.5	601.5	50	0.043	1.233	↑								

注: ↑.水平上调; ↓.水平下调(表3同)

3.4 代谢通路分析 将筛选得到的差异代谢物进行KEGG通路拓扑分析,得各代谢通路的通路影响值和P,见图4,图中气泡半径越大表示通路影响值越大;气泡颜色深浅表示 $-\lg P$,即差异代谢物参与该通路中总代谢物的比例,颜色越深表明占比越大。结果显示,寻常型银屑病潜在生物标志物的相关代谢通路有7个、开玄补肾法干预寻常型银屑病潜在生物标志物的相关代谢通路有5个。其中亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢与寻常型银屑病异常脂质代谢相关性较强(P<0.05, P<

0.01),而鞘脂代谢、亚油酸代谢和甘油磷脂代谢通路与开玄补肾法对寻常型银屑病的疗效机制相关性较强(P<0.05, P<0.01),二者共同的通路为亚油酸代谢和甘油磷脂代谢。

4 讨论

银屑病归属于中医学“白疔”“白壳疮”“蛇风”等范畴,患者病情多冬重夏轻,斑块部位干燥无汗,常伴畏寒肢冷等全身表现。本课题组提出从“玄府”角度探析银屑病病机,玄府是沟通人体内外、畅达气血津液、运转神机的通道。银屑病初起多因风

表3 开玄补肾法干预寻常型银屑病的潜在生物标志物信息
Table 3 Information on potential biomarkers for efficacy of Kaixuan Bushen method on psoriasis vulgaris

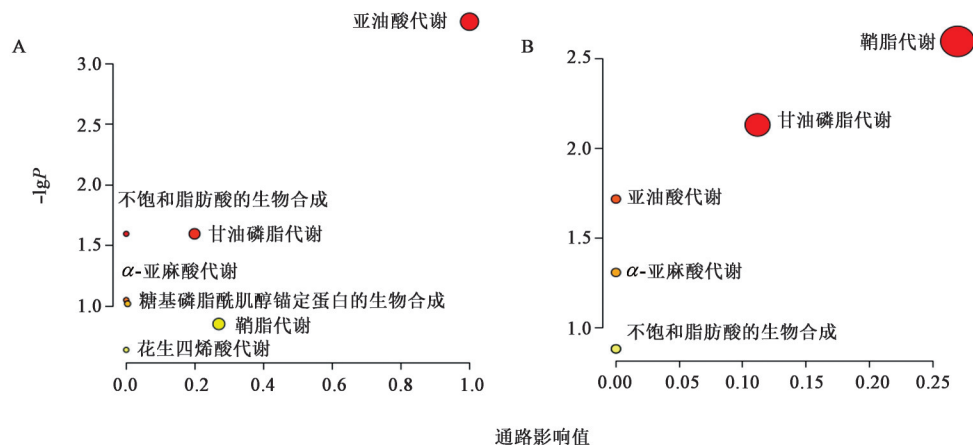
代谢物	离子模式	前体离子 m/z	产物离子 m/z	碰撞能量/V	P	VIP值	变化趋势
Cer40:2-5	正	620.6	262.2	30	0.003	1.231	↑
Cer42:1	正	650.6	264.3	30	0.000	1.050	↑
FA20:0	负	311.3	311.3	18	0.012	3.309	↓
FA23:0	负	353.3	353.3	18	0.034	1.647	↓
LPC14:0	正	468.3	184.1	30	0.023	1.052	↑
LPC22:0	正	580.4	184.1	30	0.000	1.485	↑
LPE18:0	正	482.3	341.3	20	0.000	1.017	↓
PC30:0	正	706.5	184.1	15	0.000	1.248	↓
PC38:0	正	818.6	184.1	15	0.048	1.191	↓
PC40:3	正	840.6	184.1	15	0.049	1.288	↑
PC40:5-1	正	836.6	184.1	15	0.000	1.039	↓
PC42:5-2	正	864.6	184.1	15	0.000	1.007	↓
PC42:8	正	858.6	184.1	15	0.000	1.029	↑
SM42:4	正	809.7	184.1	30	0.000	1.120	↓

邪外感或风寒束表,致使玄府开阖不畅,枢机不利,气血津液难以布散,一见皮损处汗出较少,另见胸中燥热而体表畏寒;风邪拂郁化热成毒,阻滞肌肤,故见红色肥厚斑块。综上可知,银屑病发病核心为“玄府闭郁、热毒蕴结”。《黄帝内经·素问·水热穴论篇》云:“勇而劳甚则肾汗出,肾汗出逢于风……客于玄府,行于皮里,传为附肿,本之于肾”,提示银屑病虽表现为玄府郁闭,但病之根本在肾,故立开玄补肾为治法,在传统活血解毒的基础上,加用麻黄、桂枝等以开通玄府,淫羊藿、黑顺片等以培补肾元^[7],疗效得以提升^[8-9]。同时,临床观察到开玄补

肾法对寻常型银屑病患者合并的血脂紊乱亦具有明显的改善作用^[10]。

本研究采用靶向脂质组学技术,从脂代谢角度探究开玄补肾法干预银屑病的微观变化。结果发现寻常型银屑病存在明显的脂质堆积现象,亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢通路与其异常脂代谢相关性较强,而鞘脂代谢、甘油磷脂代谢和亚油酸代谢通路与开玄补肾法对其的干预相关性较强。在健康人和寻常型银屑病患者、寻常型银屑病患者治疗前后的对比中,共有的差异代谢物为PC38:0和Cer42:1,共有的通路有亚油酸代谢和甘油磷脂代谢。开玄补肾法调节寻常型银屑病的脂质代谢分析网络见增强出版附加材料。

本研究表明亚油酸代谢异常是寻常型银屑病重要的病理机制之一,结果提示寻常型银屑病患者血清中亚油酸(FA18:2)及其下游产物花生三烯酸(FA20:3)、二十二碳四烯酸(FA22:4)相对于健康人显著增加($P<0.01$)。以往研究亦显示,在银屑病患者皮损中亚油酸及其下游产物花生四烯酸及8-、12-、15-羟基二十碳四烯酸等水平升高^[23];基于银屑病患者皮损转录组学研究的生信分析也提示,亚油酸代谢异常是银屑病病理机制的重要环节^[24]。本研究同时观察到改善亚油酸代谢也是开玄补肾法的重要疗效机制,经开玄补肾法调节后寻常型银屑病患者血清中饱和游离脂肪酸FA23:0和FA20:0水平明显下调($P<0.05$),FA18:2、FA20:3和FA22:4表达均有下降趋势,但无统计学意义。LI等^[25]采用猴耳环提取物干预咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型,结果亦提示对亚油酸代谢的调节是药物发挥疗效的关键。亚油酸及花生四烯酸的氧化产物具有较强



注:A.银屑病潜在生物标志物代谢通路;B.开玄补肾法干预寻常型银屑病的潜在生物标志物代谢通路

图4 开玄补肾法干预寻常型银屑病血清脂质代谢通路分析

Fig. 4 Metabolic pathway analysis of serum metabolites after intervention of Kaixuan Bushen method on psoriasis vulgaris

生物活性,如亚油酸的过量摄取可能会促进炎症反应^[26];13-羟基十八碳二烯酸作为亚油酸的氧化产物,是银屑病与心血管并发症之间的病理联系之一^[27];12-羟基二十碳四烯酸作为花生四烯酸的氧化产物,可促进表皮中性粒细胞和单核细胞浸润^[28]、增强巨噬细胞分泌炎症细胞因子功能^[29]、诱导氧化应激^[30]等。因此,开玄补肾法可能通过改善亚油酸代谢以调节相关的炎症反应,最终达到改善皮损的目的。

甘油磷脂代谢异常是本研究发现的寻常型银屑病另一重要病理机制,银屑病患者血清中TG、PC、LPC等甘油磷脂重要元素表达存在异常,这与以往研究报道一致^[15],如LI等^[31]对银屑病患者皮损和健康人皮肤的差异表达蛋白定量分析揭示甘油磷脂代谢异常在银屑病皮损形成过程中发挥了重要作用。本研究亦提示甘油磷脂代谢通路是开玄补肾法的疗效机制之一,其可降低在寻常型银屑病患者异常升高的TG及PC类脂质,而在(R)-沙丁胺醇干预咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型及凉血解毒方干预银屑病患者患者的研究中,均显示银屑病皮损恢复与甘油磷脂代谢的改善显著相关^[18,32]。PC38:0是本研究发现的作为寻常型银屑病和开玄补肾法对寻常型银屑病产生疗效的潜在生物标志物的脂质之一,目前尚未见其他文献报道,后续可深入探讨PC38:0对银屑病表型的具体影响,以及上下游调节机制。本研究观察到银屑病机体存在过量的PC,与冠心病的发病密切相关^[33],其可被分解为甘油二酯,并重新酯化为TG,促进脂肪变性^[34],肝细胞内TG累积可形成脂肪肝^[35],过量的TG还可引起动脉粥样硬化^[36]。此外,PC还可在磷脂酶A₂的催化下,水解产生具有较强生物活性的LPC^[37],对炎症进行双向调节^[38-39]。因此,开玄补肾法通过对甘油磷脂代谢中TG、PC和LPC等关键脂质的调节,除能够改善银屑病皮损之外,或可有效延缓、阻止银屑病并发症的发生发展。

综上所述,本研究结果表明寻常型银屑病脂质代谢紊乱主要涉及鞘脂、亚油酸和甘油磷脂等代谢通路,开玄补肾法可对其中的亚油酸和甘油磷脂代谢通路进行调节,从而改善皮损。然而,本研究亦存在一定不足,由于临床病例实际入组困难和伦理性原则,无法完全排除时间、饮食等因素对实验结果的影响。本课题组后续将在本研究基础上,对寻常型银屑病潜在生物标志物及代谢通路进行动物实验和人群队列验证,并联合体外研究深度分析开

玄补肾法通过调节脂代谢治疗寻常型银屑病的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BOEHNCKE W H, SCHÖN M P. Psoriasis [J]. Lancet, 2015, 386(9997): 983-994.
- [2] GREB J E, GOLDMINZ A M, ELDER J T, et al. Psoriasis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16082.
- [3] TAKESHITA J, GREWAL S, LANGAN S M, et al. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology [J]. J Am Acad Dermatol, 2017, 76(3): 377-390.
- [4] WANG H L, WANG Z Z, RANI P L, et al. Identification of PTPN22, ST6GAL1 and JAZF1 as psoriasis risk genes demonstrates shared pathogenesis between psoriasis and diabetes [J]. Exp Dermatol, 2017, 26(11): 1112-1117.
- [5] 曹爽,周妍妍,闫景东. 中医药调控银屑病相关信号通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 243-250.
- [6] 中华中医药学会皮肤科分会. 皮肤科分会银屑病中医治疗专家共识(2017年版)[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018, 17(3): 273-277.
- [7] 高云逸,张晓彤,李宗友,等. 基于玄府理论治疗寻常型银屑病[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(3): 113-116.
- [8] 宋坪,王晓旭,杨茂誉,等. 开通玄府、通络解毒法治斑状银屑病120例疗效观察[J]. 中医杂志, 2013, 54(17): 1476-1479.
- [9] 尹秀平,程晓菲,宋坪,等. 消银颗粒和开玄补肾方对咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型的影响[J]. 光明中医, 2019, 34(2): 220-224.
- [10] 王烁. 寻常型银屑病代谢相关特征的临床及血清代谢组学初探[D]. 北京:北京中医药大学, 2019.
- [11] 钟森杰,熊霞军,张倩,等. 主动脉弓缩窄术建立心力衰竭大鼠模型的病理过程观察与非靶向代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 117-124.
- [12] 吴琳静,余雪纯,柯佳群,等. 基于代谢组学的中药治疗化学性肝损伤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 202-215.
- [13] DONNELLY D, AUNG P P, JOUR G. The "-OMICS" facet of melanoma: Heterogeneity of genomic, proteomic and metabolomic biomarkers [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 165-174.
- [14] JOHNSON C H, IVANISEVIC J, SIUZDAK G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(7): 451-459.

- [15] ZENG C W, WEN B, HOU G X, et al. Lipidomics profiling reveals the role of glycerophospholipid metabolism in psoriasis[J]. *Gigascience*, 2017, 6(10): 1-11.
- [16] 何春燕. 基于UPLC-MS的寻常型银屑病血清脂代谢研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [17] CAO H, SU S M, YANG Q, et al. Metabolic profiling reveals interleukin-17A monoclonal antibody treatment ameliorate lipids metabolism with the potentiality to reduce cardiovascular risk in psoriasis patients [J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20(1): 16.
- [18] LIU F, WANG S P, LIU B, et al. (*R*)-Salbutamol improves imiquimod-induced psoriasis-like skin dermatitis by regulating the th17/tregs balance and glycerophospholipid metabolism [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 511.
- [19] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2017: 1008-1009.
- [20] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002: 299.
- [21] 曲圣元. 基于数据挖掘方法探究宋坪主任医师治疗银屑病用药经验[D]. 北京:北京中医药大学, 2020.
- [22] MENTER A. Psoriasis and psoriatic arthritis overview [J]. *Am J Manag Care*, 2016, 22(Suppl 8): 216-224.
- [23] SOROKIN A V, DOMENICHELLO A F, DEY A K, et al. Bioactive lipid mediator profiles in human psoriasis skin and blood[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(7): 1518-1528.
- [24] GAO Y L, YI X M, DING Y F. Combined transcriptomic analysis revealed AKR1B10 played an important role in psoriasis through the dysregulated lipid pathway and overproliferation of keratinocyte[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 8717369.
- [25] LI Y, ZONG J X, YE W J, et al. *Pithecellobium clypearia*: Amelioration effect on imiquimod-induced psoriasis in mice based on a tissue metabolomic analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 748772.
- [26] CHOQUE B, CATHELIN D, RIOUX V, et al. Linoleic acid: Between doubts and certainties [J]. *Biochimie*, 2014, 96: 14-21.
- [27] WANG Q Q, MCCORMICK T S, WARD N L, et al. Combining mechanism-based prediction with patient-based profiling for psoriasis metabolomics biomarker discovery [J]. *AMIA Annu Symp Proc*, 2017, 2017: 1734-1743.
- [28] ROSSAINT J, NADLER J L, LEY K, et al. Eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase reduces neutrophil recruitment in mouse models of acute lung injury[J]. *Crit Care*, 2012, 16(5): R166.
- [29] MABALIRAJAN U, REHMAN R, AHMAD T, et al. 12/15-Lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1540.
- [30] WEAVER J R, HOLMAN T R, IMAI Y, et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 358(1): 88-95.
- [31] LI Y, LIN P, WANG S Y, et al. Quantitative analysis of differentially expressed proteins in psoriasis vulgaris using tandem mass tags and parallel reaction monitoring[J]. *Clin Proteomics*, 2020, 17: 30.
- [32] ZHAO J X, WANG Y, CHEN W W, et al. Systems pharmacology approach and experiment evaluation reveal multidimensional treatment strategy of LiangXueJieDu formula for psoriasis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 626267.
- [33] 朱黎霞, 韦园诗, 黄星星, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS分析痰瘀互结型冠心病患者的血浆脂质组学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 110-117.
- [34] MARTÍNEZ-UÑA M, VARELA-REY M, CANO A, et al. Excess *S*-adenosylmethionine reroutes phosphatidylethanolamine towards phosphatidylcholine and triglyceride synthesis [J]. *Hepatology*, 2013, 58(4): 1296-1305.
- [35] ALVES-BEZERRA M, COHEN D E. Triglyceride metabolism in the liver [J]. *Compr Physiol*, 2017, 8(1): 1-8.
- [36] BUDOFF M. Triglycerides and triglyceride-rich lipoproteins in the causal pathway of cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiol*, 2016, 118(1): 138-145.
- [37] SHODA J, UEDA T, IKEGAMI T, et al. Increased biliary group II phospholipase A₂ and altered gallbladder bile in patients with multiple cholesterol stones [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(6): 2036-2047.
- [38] LIU P P, ZHU W, CHEN C, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 247: 117443.
- [39] HASEGAWA H, LEI J, MATSUMOTO T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances the suppressive function of human naturally occurring regulatory T cells through TGF- β production[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(3): 526-531.

[责任编辑 刘德文]