

· 药物代谢 ·

温肺化纤颗粒抗小鼠特发性肺纤维化的代谢组学分析

李姗姗¹, 黄俊¹, 李龙雪¹, 李少峰², 章程², 余筱¹, 张元兵^{2*}

(1. 江西中医药大学实验动物科技中心, 中医学院, 药学院, 南昌 330004;

2. 江西省中医院, 南昌 330006)

[摘要] 目的:探讨硫酸博莱霉素(BLM)诱导肺纤维化形成不同阶段和给药小鼠血清中差异代谢物的变化,以及温肺化纤颗粒抗特发性肺纤维化的作用机制。方法:小鼠随机分为空白组、14 d空白组、模型组、14 d模型组及温肺化纤颗粒低、高剂量组。模型组、14 d模型组和温肺化纤颗粒低、高剂量组气管注入 BLM(0.04 U/只)造模,空白组和 14 d空白组气管注入等量无菌生理盐水;温肺化纤颗粒低、高剂量组气管注入 BLM 次日起每天分别灌胃给予不同剂量温肺化纤颗粒,空白组、14 d空白组、模型组和 14 d模型组每天灌胃给予等量无菌水;14 d空白组和 14 d模型组小鼠气管注入 BLM 后 14 d取外周血制备血清,其余各组小鼠连续给药 28 d后取外周血制备血清并取材。采集小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)进行白细胞分类计数;小鼠肺组织进行病理学检测及羟脯氨酸(HYP)含量测定;采用超高效液相色谱-质谱法(UHPLC-MS)分析各组小鼠血清样本小分子代谢产物,通过主成分分析(PCA)、正交偏小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等筛选差异代谢物并进行代谢通路分析。结果:与空白组比较,模型组小鼠肺组织出现大量连续纤维化病灶,肺泡炎评分、纤维化程度评分及 HYP 含量显著上升($P<0.01$),BALF 中白细胞总数、巨噬细胞总数和淋巴细胞总数明显上升($P<0.05$)。14 d模型组较 14 d空白组共筛选出 33 个差异代谢物,以脂质代谢物为主,主要涉及氧化损伤和炎症过程;模型组较空白组共筛选出 34 个差异代谢物,以氨基酸代谢物为主,主要涉及核酸损伤和炎症过程。与模型组比较,温肺化纤颗粒高剂量组小鼠肺组织的 HYP 含量、纤维化评分及肺泡炎评分明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),BALF 中淋巴细胞总数明显下降($P<0.05$);与模型组比较,温肺化纤颗粒高、低剂量组分别筛选出 40、27 个差异代谢物;温肺化纤颗粒低、高剂量组各自与模型组的共有差异代谢物共计 9 个,主要涉及炎症相关脂质、精氨酸和色氨酸代谢途径,在温肺化纤颗粒低、高剂量组中的变化趋势较模型组均明显回调。结论:温肺化纤颗粒可减轻 BLM 所致的小鼠肺纤维化,减少胶原沉积和炎症反应,其抗纤维化作用可能与影响炎症因子、一氧化氮及氧化应激相关代谢通路有关。

[关键词] 温肺化纤颗粒; 特发性肺纤维化(IPF); 代谢组学; 硫酸博莱霉素; 超高效液相色谱-质谱法(UHPLC-MS); 炎症因子; 氧化应激

[中图分类号] R22;R28;R96;R563 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0166-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220849 [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.20220822.1048.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-22 16:40:30

Metabonomic Analysis of Wenfei Huaxian Granules Against Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Mice

LI Shanshan¹, HUANG Jun¹, LI Longxue¹, LI Shaofeng², ZHANG Cheng², YU Xiao¹, ZHANG Yuanbing^{2*}

(1. Laboratory Animal Science and Technology Center, School of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes of differential metabolites in the serum of mice at different stages of bleomycin sulfate (BLM)-induced pulmonary fibrosis modeling and administration, and the mechanism of Wenfei Huaxian granules (WHG) against idiopathic pulmonary fibrosis. **Method:** Mice were

[收稿日期] 2022-05-30

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20192BAB205101)

[第一作者] 李姗姗, 博士, 副教授, 从事药理学及毒理学研究, E-mail: 20101070@jxutcm.edu.cn

[通信作者] * 张元兵, 博士, 教授, 博士生导师, 从事肺系疾病临床与基础研究, E-mail: ybzhang68@sohu.com

randomly divided into control group, control group of 14 days, model group, model group of 14 days, low-dose WHG group and high-dose WHG group. BLM (0.04 U per mouse) was injected into the trachea of mice in the model group, model group of 14 days, low-dose WHG group and high-dose WHG group, and sterile normal saline was injected into the trachea of mice in the control group and control group of 14 days. Mice of low-dose WHG group and high-dose WHG group were given different doses of WHG by gavage every day after injection of BLM, and mice of control group, control group of 14 days, model group and model group of 14 days were given sterile water by gavage every day. The peripheral blood of mice in the control group of 14 days and model group of 14 days were taken to prepare serum after injection of BLM for 14 days, and the peripheral blood and other materials of mice in the other groups were taken after continuous administration for 28 days. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected for leucocyte differential count, the pathological examination and hydroxyproline (HYP) content determination of lung tissues of mice were performed, and the small molecule metabolites in serum samples of mice in each group were determined by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS). Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were conducted to screen differential metabolites and their biological functions were analyzed. **Result:** Compared with the control group, a large number of continuous fibrotic foci appeared in the lung tissue of mice in the model group, the alveolitis score, fibrosis degree score and HYP content increased significantly ($P < 0.01$), and the total number of leukocytes, macrophages and lymphocytes in BALF increased significantly ($P < 0.05$). A total of 33 differential metabolites were screened between the control group of 14 days and model group of 14 days, mainly lipid metabolites, which were mainly involved in oxidative damage and inflammatory process. A total of 34 differential metabolites, mainly amino acid metabolites, were screened between the control group and model group, mainly involving nucleic acid damage and inflammatory process. Compared with the model group, the HYP content, fibrosis score and alveolitis score in the lung tissue of mice from high-dose WHG group decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the total number of lymphocytes in BALF decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, 27, 40 differential metabolites were identified in the serum of mice from the low-dose WHG group and high-dose WHG group separately. There were totally 9 common differential metabolites between the model group and low-dose WHG group/high-dose WHG group, which mainly involved in the metabolic pathways of inflammation related lipids metabolism, arginine and tryptophan metabolism, and the change trends in low-dose WHG group and high-dose WHG group were significantly back-regulated compared with the model group. **Conclusion:** WHG can alleviate BLM-induced pulmonary fibrosis, collagen deposition and inflammatory reaction in mice, and its anti-fibrotic effect may be related to the adjusting of inflammatory factors, nitric oxide and oxidative stress related metabolic pathways.

[Keywords] Wenfei Huaxian granules; idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); metabolomics; bleomycin sulfate; ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS); inflammatory factors; oxidative stress

特发性肺纤维化 (IPF) 是一种病因不明的慢性进行性肺间质纤维化疾病。其起病隐匿, 患者病情逐渐加重, 晚期出现严重呼吸困难和呼吸衰竭等症状, 预后较差。因此, 亟须深入研究 IPF 的发病机制, 寻找早期诊断标志物和有效治疗手段。

IPF 属中医“肺痿”范畴^[1-2], 核心病机为阳虚寒凝、痰瘀阻络, 疾病特点为本虚标实, 病性属虚实夹杂, 病理基础为痰、瘀。肺阳虚累及脾肾, 迁延后期

致脾肺肾气阳两虚。“脾为生痰之源”“肺为贮痰之器”, 故生痰浊; 脾胃为气血生化之源, 精血同源肾精化血, 而阳虚寒凝致瘀血。痰浊瘀血又可成为致病因素, 此番反复, 病情进展。温肺化纤颗粒组方为江西中医药大学刘良徭教授运用传统中医药理论, 以阳和汤 (熟地黄、肉桂、麻黄、鹿角胶、芥子、炙甘草、炮姜) 为基础方, 加桃仁、红花、川芎、地龙、土鳖虫等活血化瘀之品而成, 针对阳虚、痰凝、血瘀的

病理基础,遵洪广祥国医大师“治肺不远温”之学术观点^[3],以温阳、化痰、行瘀为法进行辨治,在临床上取得了良好的效果^[4]。本课题组前期体外实验研究发现,其组方汤剂具有抗氧化活性^[5-7],对小鼠肺间充质干细胞(PMSCs)的氧化应激损伤具有保护作用^[8],但其体内作用机制仍有待进一步阐明。因此,本实验拟采用小鼠肺纤维化模型,通过对小鼠体内小分子代谢物的动态测定及分析,寻找肺纤维化小鼠模型的阶段性潜在生物标志物,并研究温肺化纤颗粒对肺纤维化小鼠血清潜在生物标志物的影响,以揭示其治疗IPF的作用机制,为该制剂的临床应用及IPF的临床防治提供依据。

1 材料

Vanquish型超高效液相色谱系统、Q-Exactive HF-X型轨道阱高分辨质谱仪、Heraeus Fresco17型离心机、Shandon Cytospin 4型细胞离心涂片机、Varioskan Flash型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),HistoCore PEARL型全自动组织脱水机、HistoCore Arcadia型全自动组织包埋机、RM2235型切片机、Autostainer XL ST5010-TS5015-CV5030型染色封片工作站、DM2500B型正置显微镜(德国 Leica 公司)。温肺化纤颗粒(江西中医药大学附属医院,批号20030002),硫酸博来霉素(BLM,上海源叶生物科技有限公司,批号H30N10F104559),苏木素染液、伊红染液、Masson三色染色试剂盒、瑞氏染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200335、20200826、20200617、20200714),羟脯氨酸(HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20200224),戊巴比妥钠(德国 Merck 公司,批号922L035),水为超纯水,甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级C57BL/6J雄性小鼠共36只,体质量(27±1)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产合格证号SCXK(湘)2021-0002,动物合格证号430727200101229815。动物实验于江西中医药大学实验动物科技中心进行,实验动物使用许可证号SYXK(赣)2017-0004,小鼠适应性饲养1周,所有动物实验遵循国家相关标准及实验动物护理和使用指南,并获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准,批准号JZLLSC20210010。

2 方法

2.1 动物分组与给药 36只小鼠随机分为空白组(Control组)、14 d空白组(Control_14 d组)、模型组(BLM组)、14 d模型组(BLM_14 d组)、温肺化纤颗

粒低剂量组(WHG_L组)和高剂量组(WHG_H组)。BLM组、BLM_14 d组、WHG_L和WHG_H组气管注入BLM(剂量0.04 U/只)造模,Control组和Control_14 d组气管注入等量无菌生理盐水;WHG_L组和WHG_H组气管注入BLM次日起,分别按7.305、29.22 g·kg⁻¹·d⁻¹的剂量灌胃给予温肺化纤颗粒混悬液(WHG_H组剂量相当于临床5倍等效剂量,无菌纯水配制),Control组、Control_14 d、BLM组和BLM_14 d组给予等量无菌纯水。

2.2 小鼠肺纤维化模型的制备 小鼠于造模前禁食12 h,正常饮水。腹腔注射4%戊巴比妥钠(剂量70 mg·kg⁻¹)麻醉后,将小鼠仰卧固定于实验台,开口器固定口腔,用镊子拉出舌,将光源对准小鼠脖颈处照射,调整角度,观察小鼠咽喉部,可于红色光亮处观察到声门开合。将26G留置针穿刺针头回退约0.5 cm,保证针体坚硬的同时避免损伤气道,将留置针紧贴舌根中央对准光亮处进针,插入气管后于动物吸气时注入BLM溶液100 μL(0.04 U/只),并注入空气1 mL。注射完毕后拔出留置针,抓住小鼠耳朵提起小鼠,使其身体悬空轻轻晃动,以便药液在肺内分布均匀。

2.3 标本收集 Control_14 d组和BLM_14 d组小鼠造模后14 d,麻醉后取外周血制备血清,其余各组小鼠连续给药28 d,麻醉后取外周血制备血清并取材。全血收集于离心管中,室温下静置1 h,于转速3 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径10 cm,下同),留取上层血清,分装后置于-80 °C冻存。采集支气管肺泡灌洗液(BALF)后暴露胸腔,分离肺组织,剥离双肺,左肺叶放入4%多聚甲醛中固定,常温避光保存,用于组织病理学检测,右肺液氮中速冻后置于-80 °C冻存。

2.4 BALF的采集及白细胞分类计数 小鼠取血后仰卧位置于解剖台上,固定四肢,用75%乙醇消毒小鼠颈部皮肤,颈部正中线纵行切开皮肤,钝性分离皮下结缔组织和肌肉暴露气管,分离气管周围结缔组织,游离气管,气管下食管上靠近咽部穿外科缝线以备结扎。将26G留置针穿刺针头回退约0.5 cm,保证针体坚硬的同时避免损伤气道,从小鼠口腔进针,向咽部推送,过声门时针头挑向腹侧方便进入气管,留置针针体进入气管后,用置于食管间的手术缝线在留置针进入气管处结扎,固定留置针针体,退回穿刺针头,1 mL注射器抽吸生理盐水0.8 mL,接在静脉套管针进液端,缓慢注入气管,停留30 s后缓慢回抽,可见回抽出带乳白色泡沫

状液体,即为BALF。抽出的BALF置于离心管中,重新抽吸生理盐水进行灌洗,如此反复3次。采集的BALF于转速 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,细胞沉淀加入生理盐水重悬计数,调整细胞浓度为300个/ μL 后,取细胞悬液100 μL 于 $400\times\text{g}$ 离心10 min涂片,瑞氏染色后封片供白细胞分类计数。

2.5 肺组织病理学检测 左肺常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度4 μm ,进行苏木素-伊红(HE)染色与Masson染色,光学显微镜下观察肺组织病理变化,按SZAPIEL等^[9]的方法评价各组小鼠肺组织肺炎及纤维化程度。肺炎评分标准为无(0分),无肺炎;轻度(1分),肺泡间隔增厚,有单核细胞浸润,局部胸膜病变占比20%以下,肺泡结构保存良好;中度(2分),更为广泛的肺炎,累及20%~50%的肺,但仍以胸膜为主;重度(3分),弥漫性肺炎,累及50%以上的肺,偶见单核细胞导致的肺实变,以及间质和/或肺泡内出血。纤维化评分标准为无(0分),无纤维化证据;轻度(1分),局灶性纤维化区域,累及不到20%的肺,纤维化累及胸膜和胸膜下间质,伴有肺泡结构紊乱;中度(2分),更为广泛的纤维化,涉及20%~50%的肺和纤维化区域,大多从胸膜向内延伸,但仍为局灶性的;严重(3分),广泛纤维化,累及50%以上的肺,出现实质性结构广泛紊乱的融合性病变。

2.6 肺组织中HYP含量测定 使用HYP测试盒进行测定。将右肺组织样品剪碎,置于试管中,准确加入水解液1 mL,混匀,加盖后沸水浴水解20 min。加入调pH甲、乙液调整pH 6.0~6.8,加蒸馏水至10 mL,混匀,取稀释水解液3~4 mL,加活性炭20~30 mg,混匀,于 $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。取上清液1 mL待测。空白管和标准管分别用蒸馏水和标准HYP代替。各试管分别加试剂1 0.5 mL,混匀,静置10 min,加试剂2 0.5 mL,混匀,静置5 min,加试剂3 0.5 mL,混匀,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min,冷却,于转速 $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液于96孔板,于550 nm处测定各孔吸光度 A 。计算HYP含量,公式为 $\text{HYP含量}=[(\text{测定管}A-\text{空白管}A)/(\text{标准管}A-\text{空白管}A)]\times\text{标准管质量浓度}(5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1})\times\text{水解液总体积}(10\ \text{mL})/\text{肺组织湿质量}$ 。

2.7 超高效液相色谱-质谱法(UHPLC-MS)检测

2.7.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide液相色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),流动相25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液+25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~0.5 min, 95%B; 0.5~7 min,

95%~65%B; 7~8 min, 65%~40%B; 8~9 min, 40%B; 9~9.1 min, 40%~95%B; 9.1~12 min, 95%B),柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样室温度4 $^{\circ}\text{C}$,流速0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,进样量2 μL 。

2.7.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下分别进行采集,ESI⁺喷雾电压3.6 kV,ESI⁻喷雾电压-3.2 kV,毛细管温度350 $^{\circ}\text{C}$,辅助气流速25 arb,鞘气流速30 arb,全扫描分辨率60 000,二级分辨率7 500,采集范围 m/z 70~1 050。

2.7.3 样品前处理 精密移取样品50 μL 至离心管中,加入提取液[甲醇-乙腈(1:1),含同位素标记内标混合物]200 μL ,涡旋混匀30 s,冰水浴超声处理10 min(480 W, 40 kHz),于-40 $^{\circ}\text{C}$ 静置1 h,并于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径8.6 cm),取上清于进样瓶中上机检测;所有样品另取等量上清混合成质量控制(QC)样品上机检测。

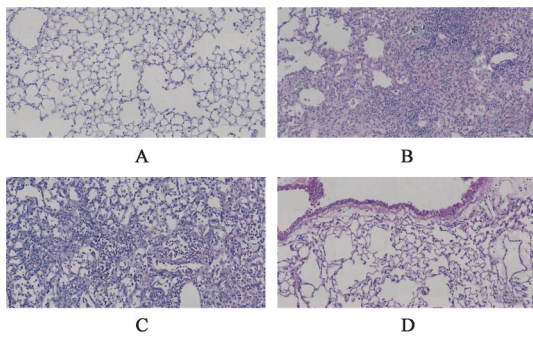
2.7.4 代谢组学数据分析 原始数据经ProteoWizard软件(版本号3.0.20287)转成mzXML格式后,使用自主编写的R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理,与BiotreeDB 2.1自建二级质谱数据库匹配,进行物质注释,算法打分的cutoff值设为0.3。使用SIMCA 16.0.2进行多元统计分析、主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。通过OPLS-DA筛选出变量重要性投影(VIP)值>1且 $P<0.05$ 的差异代谢物,利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路数据库,整理出对应物种小鼠差异代谢物映射的所有通路,并使用MetaboAnalyst 5.0软件对差异代谢物进行代谢通路分析。

2.8 统计学分析 使用SPSS 20软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析比较组间差异,肺炎和纤维化评分比较采用Kruskal-Wallis秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。使用Pearson相关性分析对连续变量进行相关性分析,肺炎和纤维化评分的相关性分析采用Spearman相关性分析。

3 结果

3.1 小鼠肺组织肺炎及纤维化情况 由图1可知,Control组小鼠肺组织结构清晰,肺泡壁完整,腔内无明显渗出水肿,偶有少量炎性细胞浸润;BLM组小鼠肺组织大部分严重毁损,肺泡腔消失,支气管周围有炎性细胞浸润;WHG_L组小鼠肺组织病理变化虽较BLM组有所减轻,但仍有大量炎症细胞

浸润;WHG_H组小鼠肺组织结构较完整,肺泡间隔稍有增厚,有少量散在炎性细胞浸润。由图2可知,BLM组小鼠肺组织中胶原纤维呈大片束状及片状分布;WHG_L组小鼠肺组织胶原沉积虽较BLM组有所减轻,但仍有散在小片沉积;WHG_H组小鼠肺组织仅有轻微的胶原纤维分布,纤维化程度较WHG_L组轻。各组肺泡炎和纤维化程度的评分见表1,结果发现与Control组比较,BLM组肺泡炎评分及纤维化程度评分显著上升($P<0.01$);WHG_H组小鼠肺泡炎评分及纤维化程度评分较BLM组均明显下降($P<0.05$)。



注:A. Control组;B. BLM组;C. WHG_L组;D. WHG_H组(图2同)

图1 温肺化纤颗粒对小鼠肺组织纤维化的影响(HE,×200)
Fig. 1 Effect of Wenfei Huaxian granules on fibrosis in mouse lung tissue (HE,×200)

3.2 小鼠肺组织HYP含量 由表1可知,Control组小鼠肺组织HYP含量较少,与Control组比较,BLM组小鼠肺组织HYP含量显著增加($P<0.01$)。与BLM组比较,给予温肺化纤颗粒后,HYP含量均降低,其中WHG_H组较BLM组显著下降($P<0.01$)。

表2 温肺化纤颗粒对小鼠BALF中炎症细胞数量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白细胞总数(×10 ³)	巨噬细胞总数(×10 ³)	淋巴细胞总数(×10 ³)	嗜酸性粒细胞总数
Control组		413.6±114.8	367.3±100.0	41.03±19.35	5 404±3 589
BLM组		2 088.0±1 052.0 ¹⁾	603.3±202.0 ¹⁾	1 479.00±1 074.00 ¹⁾	4 282±6 217
WHG_L组	7.305	1 400.0±808.0	539.8±286.0	856.00±726.20	4 400±7 226
WHG_H组	29.220	937.8±716.9	742.5±524.2	138.90±68.55 ²⁾	2 203±3 877

注:与Control组比较¹⁾ $P<0.05$;与BLM组比较²⁾ $P<0.05$

3.4 代谢组学方法学验证 QC样品PCA-X一维分布图见增强出版附加材料,QC样品全部位于区间±2S(S为标准差),说明本实验数据质量较好。

3.5 代谢轮廓 PCA得分图能直观显示出不同干预条件下各组研究对象代谢轮廓的变化。由各组小鼠血清的PCA得分图可知,各组小鼠体内小分子

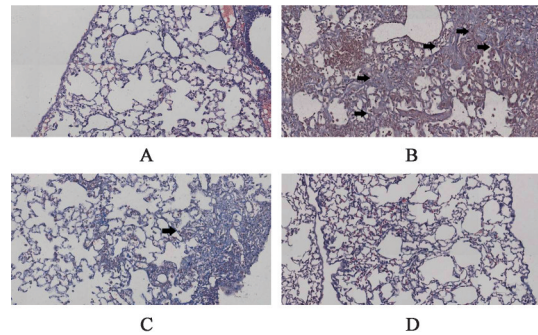


图2 温肺化纤颗粒对小鼠肺组织纤维化改变的影响(Masson,×200)

Fig. 2 Effect of Wenfei Huaxian granules on fibrotic changes in mouse lung tissue (Masson,×200)

表1 温肺化纤颗粒对小鼠肺组织肺泡炎、纤维化评分和HYP含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Wenfei Huaxian granules on alveolitis, fibrosis score and HYP content in mouse lung tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺泡炎评分/分	纤维化评分/分	HYP质量分数/mg·g ⁻¹
Control组		0.00±0.00	0.00±0.00	1.379±0.184
BLM组		2.67±0.52 ¹⁾	2.83±0.41 ¹⁾	2.331±0.334 ¹⁾
WHG_L组	7.305	1.67±1.03	2.17±0.75	1.936±0.314
WHG_H组	29.220	0.67±0.52 ²⁾	0.83±0.75 ²⁾	1.436±0.127 ³⁾

注:与Control组比较¹⁾ $P<0.01$;与BLM组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

3.3 小鼠BALF白细胞计数情况 由表2可知,BLM组较Control组白细胞总数、巨噬细胞总数和淋巴细胞总数明显增加($P<0.05$),经温肺化纤颗粒处理后,白细胞总数量及淋巴细胞总数均有下降的趋势,其中WHG_H组的淋巴细胞总数较BLM组明显下降($P<0.05$)。

代谢产物发生了变化,见增强出版附加材料。为进一步建立各组间的特异性差异模型,采用OPLS-DA对各组小鼠血清代谢组学数据展开模式识别,结果表明BLM_14 d组和Control_14 d组、BLM组和Control组、WHG_L组和BLM组、WHG_H组和BLM组中代谢产物均发生了明显变化,OPLS-DA

得分散点图见增强出版附加材料。

3.6 差异代谢物的筛选 与 Control_14 d组比较, BLM_14 d组共有33个物质含量发生变化, 主要为腺苷、羟基脱氧鸟苷、腺嘌呤等核酸代谢相关产物, 磷脂酰胆碱(PC)、12-羟基-5,8,10,14,17-二十碳五烯酸(12-HEPE)、12-羟基二十碳四烯酸(12-HETE)等脂质代谢相关产物, 以及 γ -氨基丁酸、L-谷氨酸、甲基咪唑乙醛等氨基酸代谢相关产物, 见表3。与

Control组比较, BLM组共有34个物质含量发生变化, 主要为8-中链羟基二十碳四烯酸(8-HETE)、黄嘌呤核苷、D-核糖等核酸代谢相关产物, 多种PC、肝素A₃、皮质酮等脂质代谢相关产物, 以及L-单甲基精氨酸、非对称二甲基精氨酸、犬尿喹啉酸等氨基酸代谢相关产物。BLM_14 d组与BLM组共有差异代谢产物13种, 除5'-甲基硫代腺苷外, 与各自空白组比较的变化趋势均一致, 见表3。

表3 造模阶段各组小鼠血清差异代谢物的信息及变化趋势

Table 3 Information and trend of serum differential metabolites in mice from each group during modeling stage

No.	代谢产物	BLM_14 d组与Control_14 d组				BLM组与Control组			
		VIP值	变化倍数	变化趋势	P	VIP值	变化倍数	变化趋势	P
1	腺苷	2.18	47.45	↑	0.022 2	-	-	-	-
2	羟基脱氧鸟苷	2.17	62.99	↑	0.026 0	-	-	-	-
3	PC(P-16:0/15:0)	2.07	0.05	↓	0.009 2	-	-	-	-
4	PC[18:1(11Z)/14:0]	1.85	1.88	↑	0.022 4	-	-	-	-
5	PC[18:2(9Z,12Z)/14:0]	1.82	1.47	↑	0.011 6	-	-	-	-
6	甲基咪唑乙醛	1.81	2.02	↑	0.006 6	-	-	-	-
7	PC[18:3(6Z,9Z,12Z)/15:0]	1.81	1.46	↑	0.041 5	-	-	-	-
8	PC[20:3(8Z,11Z,14Z)/14:0]	1.63	1.17	↑	0.039 4	-	-	-	-
9	PC[22:2(13Z,16Z)/14:1(9Z)]	1.58	1.74	↑	0.026 9	-	-	-	-
10	3-甲基腺嘌呤	1.55	1.50	↑	0.043 9	-	-	-	-
11	2-丁酮酸	1.50	0.69	↓	0.001 5	-	-	-	-
12	前列腺素D ₂	1.43	0.73	↓	0.001 3	-	-	-	-
13	3-磺基丙氨酸	1.43	0.30	↓	0.026 5	-	-	-	-
14	亚牛磺酸	1.43	0.38	↓	0.007 0	-	-	-	-
15	10E,12Z-十八碳二烯酸	1.39	0.66	↓	0.004 1	-	-	-	-
16	棕榈油酸	1.34	0.52	↓	0.019 7	-	-	-	-
17	牛磺酸	1.27	0.62	↓	0.041 5	-	-	-	-
18	白三烯B ₄	1.25	0.29	↓	0.005 9	-	-	-	-
19	葵酸	1.22	0.65	↓	0.024 0	-	-	-	-
20	硬脂酸	1.10	0.63	↓	0.043 7	-	-	-	-
21	γ -氨基丁酸	1.99	0.68	↓	0.003 4	1.75	0.58	↓	0.035 5
22	L-谷氨酸	1.85	0.50	↓	0.012 1	2.00	0.29	↓	0.020 3
23	软脂酸	1.62	0.61	↓	0.000 1	1.35	0.83	↓	0.044 9
24	PC[22:2(13Z,16Z)/15:0]	1.53	0.80	↓	0.040 3	1.74	0.69	↓	0.022 3
25	2-吡啶羧酸	1.54	0.78	↓	0.000 6	1.61	0.71	↓	0.035 2
26	5'-甲基硫代腺苷	1.45	0.41	↓	0.008 4	1.89	1.37	↑	0.003 5
27	12-HEPE	1.44	0.35	↓	0.002 0	1.69	0.57	↓	0.034 5
28	肝素A ₃	1.44	0.41	↓	0.049 2	1.67	0.60	↓	0.023 6
29	肝素B ₃	1.38	0.50	↓	0.003 3	1.75	0.67	↓	0.042 4
30	12-HETE	1.31	0.47	↓	0.004 0	1.82	0.63	↓	0.018 7
31	腺嘌呤	1.30	4.94	↑	0.028 5	1.62	1.86	↑	0.047 7
32	α -亚麻酸	1.28	0.56	↓	0.024 8	1.38	0.70	↓	0.048 2
33	前列腺素G ₂	1.19	0.29	↓	0.043 1	1.65	0.49	↓	0.033 8

续表 3

No.	代谢产物	BLM_14 d组与 Control_14 d组				BLM组与 Control组			
		VIP值	变化倍数	变化趋势	P	VIP值	变化倍数	变化趋势	P
34	黄嘌呤核苷	-	-	-	-	2.07	0.19	↓	0.036 3
35	L-单甲基精氨酸	-	-	-	-	2.02	0.62	↓	0.003 9
36	8-HETE	-	-	-	-	2.01	0.70	↓	0.005 0
37	PC[22:5(7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/18:2(9Z, 12Z)]	-	-	-	-	1.98	1.62	↑	0.003 1
38	非对称二甲基精氨酸	-	-	-	-	1.96	0.79	↓	0.012 4
39	PC[24:1(15Z)/20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)]	-	-	-	-	1.90	0.51	↓	0.003 1
40	L-色氨酸	-	-	-	-	1.85	0.50	↓	0.018 0
41	PC[22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)]	-	-	-	-	1.79	0.37	↓	0.009 3
42	3-羟基邻氨基苯甲酸	-	-	-	-	1.72	1.66	↑	0.018 6
43	皮质酮	-	-	-	-	1.54	3.35	↑	0.010 1
44	PC[P-18:0/22:4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z)]	-	-	-	-	1.37	0.68	↓	0.042 2
45	D-核糖	-	-	-	-	1.78	1.62	↑	0.037 5
46	L-缬氨酸	-	-	-	-	1.76	0.64	↓	0.033 4
47	L-赖氨酸	-	-	-	-	1.74	0.65	↓	0.023 3
48	N-乙酰基-L-丙氨酸	-	-	-	-	1.65	0.69	↓	0.032 2
49	鸟氨酸	-	-	-	-	1.64	0.62	↓	0.023 7
50	瓜氨酸	-	-	-	-	1.54	0.69	↓	0.029 7
51	L-苯丙氨酸	-	-	-	-	1.44	0.75	↓	0.036 7
52	L-酪氨酸	-	-	-	-	1.37	0.48	↓	0.045 4
53	犬尿喹啉酸	-	-	-	-	1.36	0.40	↓	0.025 4
54	L-脯氨酸	-	-	-	-	1.28	0.69	↓	0.036 6

与BLM组比较,WHG_L组共筛选出27个差异代谢物,主要是猕猴桃碱、甘草次酸等为代表的药物成分代谢产物,18-羟基皮质酮、溶血磷脂酰乙醇胺及PC等脂质代谢相关产物,D-核糖等核酸代谢相关产物,以及1,3-二甲基尿嘧啶、3-羟基邻氨基苯甲酸、犬尿喹啉酸等氨基酸代谢相关产物,见表4。与BLM组比较,WHG_H组共筛选出40个差异代谢物,主要为药物成分代谢产物,3-羟基异戊酰基肉碱、PC、白三烯B₅等脂质代谢相关产物,次黄嘌呤等核酸代谢相关产物,3-羟基邻氨基苯甲酸、苯乳酸、吡啶乳酸等氨基酸代谢相关产物,以及泛酸等糖代谢相关产物,见表4。其中WHG_L组、WHG_H组与BLM组的共有差异代谢产物分别为9、4种。给药后,温肺化纤颗粒能使共有差异代谢物呈良好回调趋势。与BLM组比较,温肺化纤颗粒可明显下调3-羟基邻氨基苯甲酸和D-核糖的水平,并明显上调L-单甲基精氨酸、PC[22:2(13Z, 16Z)/15:0]、PC[P-18:0/22:4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z)]、PC[24:1(15Z)/20:

5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)]、犬尿喹啉酸、肝素A₃、前列腺素G₂共7个差异代谢物的水平。

3.7 代谢通路分析 通过MetaboAnalyst 5.0软件对各组差异代谢物进行代谢通路分析,结果表明BLM_14 d组重要的差异代谢物在牛磺酸和低牛磺酸代谢、 α -亚麻酸代谢、花生四烯酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丁酸盐代谢和组氨酸代谢通路明显富集(Raw $P < 0.05$);BLM组重要的差异代谢物在氨酰转运RNA(tRNA)生物合成、精氨酸生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、 α -亚麻酸代谢和丁酸盐代谢通路明显富集(Raw $P < 0.05$)。WHG_L组重要的差异代谢产物主要在亚油酸代谢和花生四烯酸代谢通路富集(Raw $P < 0.1$);WHG_H组重要的差异代谢产物主要在亚油酸代谢通路富集(Raw $P < 0.1$),见增强出版附加材料。

3.8 相关性分析 对BLM组、WHG_L组和WHG_H组的共有差异代谢产物L-单甲基精氨酸和

表4 温肺化纤颗粒对小鼠血清差异代谢物变化趋势的影响

Table 4 Effect of Wenfei Huaxian granules on trend of serum differential metabolites in mice

No.	代谢产物	WHG_L与BLM组				WHG_H与BLM组			
		VIP值	变化倍数	变化趋势	P	VIP值	变化倍数	变化趋势	P
1	黄嘌呤核苷	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8-HETE	-	-	-	-	-	-	-	-
3	L-谷氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
4	PC[22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:2(9Z,12Z)]	-	-	-	-	-	-	-	-
5	非对称二甲基精氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
6	5'-甲基硫代腺苷	-	-	-	-	-	-	-	-
7	L-色氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
8	PC[22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	-	-	-	-	-	-	-	-
9	γ-氨基丁酸	-	-	-	-	-	-	-	-
10	皮质酮	-	-	-	-	-	-	-	-
11	12-HETE	-	-	-	-	-	-	-	-
12	L-缬氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
13	肝素B ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
14	L-赖氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
15	12-HEPE	-	-	-	-	-	-	-	-
16	N-乙酰基-L-丙氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
17	鸟氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
18	腺嘌呤	-	-	-	-	-	-	-	-
19	2-吡啶羧酸	-	-	-	-	-	-	-	-
20	瓜氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
21	L-苯丙氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
22	α-亚麻酸	-	-	-	-	-	-	-	-
23	L-酪氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
24	软脂酸	-	-	-	-	-	-	-	-
25	L-脯氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
26	L-单甲基精氨酸	1.39	1.42	↑	0.037 0	1.44	1.38	↑	0.038 8
27	PC[22:2(13Z,16Z)/15:0]	1.84	1.55	↑	0.005 6	1.68	1.34	↑	0.016 1
28	3-羟基邻氨基苯甲酸	1.93	0.56	↓	0.001 7	2.27	0.45	↓	0.001 3
29	PC[P-18:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	1.47	1.92	↑	0.014 3	1.96	1.86	↑	0.000 6
30	PC[24:1(15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]	1.89	2.01	↑	0.002 0	-	-	-	-
31	肝素A ₃	1.33	1.57	↑	0.049 3	-	-	-	-
32	D-核糖	1.60	0.65	↓	0.046 6	-	-	-	-
33	前列腺素G ₂	1.51	1.93	↑	0.049 9	-	-	-	-
34	犬尿喹啉酸	1.19	1.88	↑	0.014 4	-	-	-	-
35	L-2-氨基-3-亚甲基己酸	2.30	4.42	↑	0.000 1	2.40	6.97	↑	0.000 9
36	猕猴桃碱	2.28	5 423.95	↑	0.082 0	2.40	5 305.81	↑	0.002 1
37	3β,6β-二羟基去甲基萆苳烷	2.28	4.68	↑	0.001 1	2.44	7.99	↑	0.000 0
38	芽子碱	2.27	2.58	↑	0.000 0	2.39	3.74	↑	0.000 1
39	甘草次酸	2.25	497.12	↑	0.000 5	2.35	1 370.92	↑	0.031 3
40	calystegin A ₃	2.22	1.87	↑	0.000 0	2.28	2.46	↑	0.000 7

续表 4

No.	代谢产物	WHG_L与BLM组				WHG_H与BLM组			
		VIP值	变化倍数	变化趋势	P	VIP值	变化倍数	变化趋势	P
41	homolanthionine	2.12	16.47	↑	0.072 4	2.41	26.07	↑	0.001 2
42	phloretin	2.33	18.57	↑	0.012 4	2.49	55.35	↑	0.001 8
43	苯基乙醛酸	2.11	4.50	↑	0.041 9	2.48	6.82	↑	0.003 9
44	白三烯 B ₅	2.38	0.11	↓	0.005 8	2.13	0.20	↓	0.008 4
45	18-羟基皮质酮	2.04	0.30	↓	0.004 1	-	-	-	-
46	马尿酸	2.02	2.59	↑	0.010 7	-	-	-	-
47	1,3-二甲基尿嘧啶	2.01	1.77	↑	0.000 3	-	-	-	-
48	溶血磷脂酰乙醇胺[18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0]	2.01	1.53	↑	0.000 3	-	-	-	-
49	N-乙酰谷氨酸	2.27	2.00	↑	0.000 2	-	-	-	-
50	鼠尾草酸	2.24	0.10	↓	0.010 1	-	-	-	-
51	糖精	2.17	7.09	↑	0.012 0	-	-	-	-
52	乙基葡萄糖醛酸苷	2.14	4.45	↑	0.002 2	-	-	-	-
53	泛酸	-	-	-	-	2.34	24.22	↑	0.006 7
54	3-羟基异戊酰基肉碱	-	-	-	-	2.37	0.41	↓	0.000 3
55	酪氨酸甲酯	-	-	-	-	2.29	0.33	↓	0.001 1
56	PC[18:1(9Z)/P-18:1(11Z)]	-	-	-	-	2.26	1.80	↑	0.000 0
57	N1-甲基-4-吡啶酮-3-甲酰胺	-	-	-	-	2.23	0.48	↓	0.001 0
58	PC[18:2(9Z,12Z)/P-18:1(11Z)]	-	-	-	-	2.21	1.52	↑	0.000 1
59	PC[22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	-	-	-	-	2.16	0.56	↓	0.000 4
60	鞘氨醇	-	-	-	-	2.10	0.47	↓	0.006 6
61	PC(P-18:0/16:0)	-	-	-	-	2.08	1.58	↑	0.001 1
62	PC[20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:0]	-	-	-	-	2.06	1.30	↑	0.000 2
63	咪唑-4-乙醛	-	-	-	-	2.04	0.75	↓	0.004 8
64	苯乳酸	-	-	-	-	2.34	3.41	↑	0.001 2
65	次黄嘌呤	-	-	-	-	2.23	0.32	↓	0.000 3
66	(10E,12Z)-(9S)-9-氢过氧十八烷-10,12-二烯酸	-	-	-	-	2.12	0.27	↓	0.029 5
67	2-羟基乙磺酸酯	-	-	-	-	2.10	0.59	↓	0.010 8
68	吡啶乳酸	-	-	-	-	2.06	2.00	↑	0.001 3
69	N5-(4-甲氧基苄基)谷氨酸	-	-	-	-	2.32	4.24	↑	0.000 0
70	脯氨酸甜菜碱	-	-	-	-	2.13	2.17	↑	0.000 1
71	4-胍基丁酸	-	-	-	-	2.11	2.47	↑	0.000 4
72	persicachrome	-	-	-	-	2.02	2.24	↑	0.000 2
73	苯氧基乙酸	-	-	-	-	2.33	2.84	↑	0.000 0
74	mesaconic acid	-	-	-	-	2.26	2.16	↑	0.000 1
75	对乙酰氨基酚	-	-	-	-	2.05	3.40	↑	0.016 5
76	马尿酸	-	-	-	-	2.03	2.18	↑	0.004 4
77	肉桂酰甘氨酸	-	-	-	-	2.02	2.24	↑	0.001 7
78	D-葡萄糖	-	-	-	-	2.01	2.38	↑	0.004 4

3-羟基邻氨基苯甲酸的代谢组学数据与对应小鼠的炎症及纤维化指标进行相关性分析,结果表明L-单

甲基精氨酸与肺组织肺泡炎评分、纤维化评分、HYP含量、BLAF白细胞总数及淋巴细胞总数呈显

著负相关;3-羟基邻氨基苯甲酸与肺组织肺泡炎评分、纤维化评分、HYP含量、BLAF白细胞总数和淋巴细胞总数呈显著正相关,见表5。

表5 小鼠炎症及纤维化指标与血清样本纤维化相关代谢差异物之间的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between inflammation and fibrosis indexes and fibrosis related differential metabolites in serum samples of mice

炎症及纤维化指标	L-单甲基精氨酸		3-羟基邻氨基苯甲酸	
	相关系数	P	相关系数	P
肺组织肺泡炎评分	-0.603 0	0.001 8	0.517 4	0.009 6
肺组织纤维化评分	-0.578 8	0.003 0	0.543 5	0.006 1
肺组织HYP含量	-0.755 7	<0.000 1	0.749 5	<0.000 1
BLAF白细胞总数	-0.740 2	<0.000 1	0.604 2	0.001 8
BLAF巨噬细胞总数	-0.411 3	0.045 8	0.182 2	0.394 0
BLAF淋巴细胞总数	-0.729 6	<0.000 1	0.631 4	0.000 9
BLAF嗜酸性粒细胞总数	-0.464 0	0.022 4	0.351 1	0.092 6

4 讨论

IPF病因不明、病程缓慢,早期缺乏典型特征性临床表现,确诊患者呈现普通型间质性肺炎(UIP)组织病理学特征^[10],初期多见细胞炎症及大量炎症细胞浸润,晚期见大量成纤维细胞增生及胶原沉积,并最终发展成不可逆的肺间质纤维化^[11]。本文通过气管给予BLM方式诱导肺纤维化小鼠模型,造模28 d后,与Control组比较,小鼠肺组织纤维化严重,有大量炎症细胞浸润,符合IPF临床表现。与BLM组比较,高剂量温肺化纤颗粒可显著降低BLM所致的小鼠肺组织纤维化及炎症程度,发挥保护作用。为了更好地挖掘肺纤维化进程的阶段性生物标志物,为临床诊断,尤其是早期诊断提供参考^[12],并对温肺化纤颗粒发挥治疗作用的分子机制进行更全面的代谢组学解读,笔者分别对气管注入BLM后14 d和28 d的小鼠及气管注入BLM次日起连续给予低、高剂量温肺化纤颗粒28 d小鼠血清中的差异代谢物进行了筛选。

小鼠纤维化造模早期的BLM_14 d组较Control_14 d组的血清差异代谢物以脂质代谢物变化为主,主要涉及氧化损伤和炎症过程。脂质代谢方面,与Control_14 d组比较,BLM_14 d组小鼠血清中具有潜在抗炎活性的 α -亚麻酸明显减少^[13],在炎症发生发展过程中起到重要作用的多种PC、前列腺素、白三烯和肝素等也有明显变化^[14-24]。氨基酸代谢方面,BLM_14 d组小鼠血清亚牛磺酸和牛磺

酸较Control_14 d组均明显下降,提示机体通过消耗亚牛磺酸保护超氧化物歧化酶(SOD),应对肺纤维化过程中的氧化应激^[25-28],而涉及组氨酸代谢通路的L-谷氨酸和甲基咪唑乙醛较Control_14 d组分别明显降低和升高,提示组氨酸代谢途径偏向组胺生产路径,而组胺在炎症发生和进行过程中也起到非常重要的作用,符合IPF早期炎症表现。小鼠纤维化造模后期的BLM组较Control组的血清差异代谢物以氨基酸代谢物为主,主要涉及核酸损伤和炎症过程。氨基酸代谢方面,差异代谢物主要富集在精氨酸和脯氨酸代谢、色氨酸代谢通路。精氨酸一方面作为一氧化氮(NO)合酶(NOS)的底物,最终被分解为NO和瓜氨酸,另一方面在精氨酸酶的催化下生成鸟氨酸,继而转化为脯氨酸。作为肺纤维化损伤修复的关键性物质,NO在IPF的发生、发展、诊断,甚至治疗中都具有重要作用^[29-33],而脯氨酸的供应对于胶原蛋白合成具有至关重要的作用^[34]。此外,哺乳动物细胞中存在3种形式的甲基化精氨酸——对称二甲基精氨酸、非对称二甲基精氨酸和L-单甲基精氨酸,其中非对称二甲基精氨酸和L-单甲基精氨酸是NOS的竞争性抑制剂^[35],对NOS的抑制可使BLM气管诱导的小鼠肺损伤和炎症指标明显减轻^[36]。BLM组较Control组小鼠血清中非对称二甲基精氨酸和L-单甲基精氨酸,以及精氨酸的中下游产物瓜氨酸、鸟氨酸、L-脯氨酸均呈下降趋势,由于精氨酸相对丰度不具有显著差异性,故排除由于精氨酸减少而导致代谢产物水平下降的可能性,同时也印证了ZHAO等^[37]提出的IPF患者体内精氨酸可通过其他回补途径来保持稳定的结论,由此推测非对称二甲基精氨酸和L-单甲基精氨酸的减少使得NO水平上升,导致细胞线粒体损伤,而L-脯氨酸可能由于转化为细胞外基质沉积消耗过多导致相对丰度下降。在色氨酸分解代谢途径中,作为犬尿氨酸途径的下游代谢物,3-羟基邻氨基苯甲酸可通过抑制线粒体呼吸影响能量代谢,产生细胞毒性作用,促进蛋白质氧化损伤并诱导细胞凋亡^[38-39],具有抗炎和免疫调节作用^[40-48]。BLM组较Control组小鼠血清中L-色氨酸与犬尿喹啉酸的水平明显降低,而3-羟基邻氨基苯甲酸水平明显升高,推测肺纤维化过程中色氨酸-犬尿氨酸代谢增强,是导致蛋白质氧化损伤与细胞凋亡的原因之一。脂质代谢方面,仍有参与能量调节、免疫反应和应激反应的多种PC、8-HETE和皮质酮^[49-50]呈现明显变化。总之,在肺纤维化造模的不同发展阶

段, 差异代谢标志物主要涉及氨基酸、脂质和核酸代谢。纤维化发展早期以脂质差异代谢物变化为主, 主要涉及氧化损伤和炎症过程; 纤维化发展后期以氨基酸差异代谢物为主, 主要涉及核酸损伤和炎症过程, 与临床代谢组学结果相印证^[51], 并与本实验中BLM组小鼠肺部炎症加重的表现一致。

WHG_L组、WHG_H组与BLM组的共有差异代谢物及富集代谢通路主要涉及炎症相关脂质、精氨酸和色氨酸代谢途径, 经温肺化纤颗粒干预后, 共有差异代谢物在模型组中的变化均出现了不同程度的回调, 表明这些差异代谢物与温肺化纤颗粒抗肺纤维化机制密切相关, 即温肺化纤颗粒可能通过影响炎症因子、NO及氧化应激相关代谢通路发挥抗BLM诱导的纤维化作用, 该推断经小鼠炎症及纤维化指标与血清样本纤维化相关代谢差异物之间的相关性分析得到了进一步验证, 也与本课题组前期体外实验证实温肺化纤颗粒对过氧化氢(H₂O₂)诱导小鼠肺间充质干细胞氧化应激损伤的保护作用^[8]相一致。

本实验选取BLM诱导的小鼠肺纤维化模型为研究对象, 易于操作、可重复性强, 但IPF是多种个体及表观遗传突变和环境风险因素共同作用的结果, 单纯采用BLM诱导小鼠肺纤维化模型具有一定的局限性^[52], 筛选出的代谢组学标志物也有待体内实验进一步验证, 以期对IPF的预防与治疗提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 晁恩祥, 张纾难, 王微, 等. 肺痿再辨识[J]. 北京中医药大学学报, 1997, 20(5): 14-15.

[2] 张纾难. 试论瘀血肺痿[J]. 上海中医药杂志, 1994, 28(1): 7-9.

[3] 赵风达, 蔡灿林. 洪广祥“治肺不远温”在慢性哮喘病中的运用[J]. 江西中医药, 1993, 24(2): 3-4.

[4] 柯诗文, 李少峰, 张元兵, 等. 全程温法治疗肺间质纤维化的再思考[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4078-4081.

[5] 兰智慧, 张元兵, 李少峰, 等. 刘良倚教授运用温肺化纤汤治疗肺间质纤维化经验[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(10): 3141-3143.

[6] 朱伟, 胡梦梅, 卢传礼, 等. 温肺化纤汤乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1741-1743.

[7] 朱伟, 王敏, 张元兵, 等. 不同提取方法对温肺化纤汤提取物的抗氧化活性评价[J]. 中医药通报, 2014, 13

(3): 59-62.

[8] 龚年金, 兰智慧, 朱伟, 等. 温肺化纤汤对H₂O₂诱导小鼠肺间充质干细胞氧化应激损伤的保护作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3465-3469.

[9] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.

[10] 张喆, 赵舒, 韩云鹏, 等. 补阳还五汤对特发性肺纤维化大鼠Keap1/Nrf2/HO-1抗氧化信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 9-16.

[11] BARRATT S L, CREAMER A, HAYTON C, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): An overview [J]. J Clin Med, 2018, 7(8): 201.

[12] LUPPI F, KALLURI M, FAVERIO P, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis beyond the lung: Understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 109.

[13] 任杰, 杨泽华, 郑圣颀, 等. α -亚麻酸的体外抗炎作用机制研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(S1): 419-426.

[14] DENNIS E A, NORRIS P C. Eicosanoid storm in infection and inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(8): 511-523.

[15] CORAS R, KAVANAUGH A, BOYD T, et al. Pro- and anti-inflammatory eicosanoids in psoriatic arthritis [J]. Metabolomics, 2019, 15(4): 65.

[16] FURSE S, DE KROON A I. Phosphatidylcholine's functions beyond that of a membrane brick [J]. Mol Membr Biol, 2015, 32(4): 117-119.

[17] KIDA T, AYABE S, OMORI K, et al. Prostaglandin D₂ attenuates bleomycin-induced lung inflammation and pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167729.

[18] AFONSO P V, JANKA-JUNTILA M, LEE Y J, et al. LTB₄ is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis [J]. Dev Cell, 2012, 22(5): 1079-1091.

[19] TAMANG D L, PIRZAI W, PRIEBE G P, et al. Hepoxilin A₃ facilitates neutrophilic breach of lipoxygenase-expressing airway epithelial barriers [J]. J Immunol, 2012, 189(10): 4960-4969.

[20] PACE-ASCIAK C R. Hepoxilins: A review on their cellular actions [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1215(1/2): 1-8.

[21] DE SOUZA C O, VALENZUELA C A, BAKER E J, et al. Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(20): e1800322.

- [22] SOUZA C O, TEIXEIRA A A, BIONDO L A, et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF κ B, independently of PPARs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(5):566-575.
- [23] SENGUPTA A, GHOSH M. Comparison of native and capric acid-enriched mustard oil effects on oxidative stress and antioxidant protection in rats [J]. *Br J Nutr*, 2012, 107(6):845-849.
- [24] STETINOVÁ V, SMETANOVÁ L, GROSSMANN V, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2002, 21(2):153-162.
- [25] ALKADI H. A review on free radicals and antioxidants [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2020, 20(1):16-26.
- [26] CONRADO A B, D'ANGELANTONIO M, D'ERME M, et al. The interaction of hypotaurine and other sulfinates with reactive oxygen and nitrogen species: A survey of reaction mechanisms [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 975(Pt 1):573-583.
- [27] PECCI L, MONTEFOSCHI G, FONTANA M, et al. Hypotaurine and superoxide dismutase: Protection of the enzyme against inactivation by hydrogen peroxide and peroxidation to taurine [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 483:163-168.
- [28] RICHER B C, SALEI N, LASKAY T, et al. Changes in neutrophil metabolism upon activation and aging [J]. *Inflammation*, 2018, 41(2):710-721.
- [29] SCHWENTKER A, VODOVOTZ Y, WELLER R, et al. Nitric oxide and wound repair: Role of cytokines? [J]. *Nitric Oxide*, 2002, 7(1):1-10.
- [30] SCHROEDER R A, KUO P C. Nitric oxide: physiology and pharmacology [J]. *Anesth Analg*, 1995, 81(5):1052-1059.
- [31] CAMELI P, BERGANTINI L, SALVINI M, et al. Alveolar concentration of nitric oxide as a prognostic biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Nitric Oxide*, 2019, 89:41-45.
- [32] CAMELI P, BARGAGLI E, BERGANTINI L, et al. Evaluation of multiple-flows exhaled nitric oxide in idiopathic and non-idiopathic interstitial lung disease [J]. *J Breath Res*, 2019, 13(2):026008.
- [33] BLANCO I, RIBAS J, XAUBET A, et al. Effects of inhaled nitric oxide at rest and during exercise in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Appl Physiol*, 2011, 110(3):638-645.
- [34] KRANE S M. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens [J]. *Amino Acids*, 2008, 35(4):703-710.
- [35] JANSSEN W, PULLAMSETTI S S, COOKE J, et al. The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) in pulmonary fibrosis [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2):242-249.
- [36] GENOVESE T, CUZZOCREA S, PAOLA R D, et al. Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury [J]. *Respir Res*, 2005, 6(1):58.
- [37] ZHAO Y D, YIN L, ARCHER S, et al. Metabolic heterogeneity of idiopathic pulmonary fibrosis: A metabolomic study [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2017, 4(1):e000183.
- [38] REYES-OCAMPO J, RAMÍREZ-ORTEGA D, CERVANTES G I V, et al. Mitochondrial dysfunction related to cell damage induced by 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid: Non-dependent-effect of early reactive oxygen species production [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 50:81-91.
- [39] QUAGLIARIELLO E, PAPA S, SACCONI C, et al. Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on the mitochondrial respiratory system [J]. *Biochem J*, 1964, 91(1):137-146.
- [40] MEZRICH J D, FECHNER J H, ZHANG X J, et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2010, 185(6):3190-3198.
- [41] FRUMENTO G, ROTONDO R, TONETTI M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(4):459-468.
- [42] YAN Y P, ZHANG G X, GRAN B, et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2010, 185(10):5953-5961.
- [43] MELLOR A L, MUNN D H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(10):762-774.
- [44] ZHAO C J, WU K Y, BAO L J, et al. Kynurenic acid protects against mastitis in mice by ameliorating inflammatory responses and enhancing blood-milk barrier integrity [J]. *Mol Immunol*, 2021, 137:134-144.
- [45] LEE T, PARK H S, JEONG J H, et al. Kynurenic acid attenuates pro-inflammatory reactions in lipopolysaccharide-stimulated endothelial cells through the PPAR δ /HO-1-dependent pathway [J]. *Mol Cell*

- Endocrinol, 2019, 495: 110510.
- [46] DYER D P, SALANGA C L, JOHNS S C, et al. The anti-inflammatory protein TSG-6 regulates chemokine function by inhibiting chemokine/glycosaminoglycan interactions[J]. J Biol Chem, 2016, 291(24): 12627-12640.
- [47] MILNER C M, HIGMAN V A, DAY A J. TSG-6: A pluripotent inflammatory mediator? [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt 3): 446-450.
- [48] WANG G, CAO K, LIU K L, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(7): 1209-1223.
- [49] KAHRI A I, VOUTILAINEN R, SALMENPERÄ M. Different biological action of corticosteroids, corticosterone and cortisol, as a base of zonal function of adrenal cortex [J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1979, 91(2): 329-337.
- [50] JORGENSEN A, KALLIOKOSKI O, FORSBERG K, et al. A chronic increase of corticosterone age-dependently reduces systemic DNA damage from oxidation in rats [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 104: 64-74.
- [51] MILENKOVIC M R, KLISIC A, CERIMAN V, et al. Oxidative stress and inflammation parameters-novel biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26(3): 927-934.
- [52] 白明, 王赛, 谢逸轩, 等. 基于中西医临床病证特点的肺纤维化动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13): 244-250.
- [责任编辑 刘德文]

·书讯·

延续性护理干预对急性心肌梗死患者PCI术后的影响 ——评《手术室人文护理与沟通技巧》

临床上急性心肌梗死是较为常见的多发性心脏系统疾病,致残率较高,死亡率占城乡居民总死亡原因的首位,已成为重大的公共卫生问题。这与生活方式不健康、饮食习惯差、缺乏锻炼等因素有关。其主要由不稳定斑块破裂血栓,引发血管急性堵塞、心肌缺血坏死导致。治疗急性心肌梗死最为有效方法是经皮冠状动脉介入术(PCI)治疗,PCI技术因创口小,手术操作成熟,是心肌再灌注治疗的一种主流手段。在局部麻醉作用下,经桡动脉/股动脉穿刺口送入导丝,将球囊送入病变部位的血管,通过球囊充气放气,将血管壁外推,使狭窄的冠状动脉扩张的一种介入治疗,以开通患者闭塞冠状动脉,使心肌再灌注,快速挽救未坏死心肌,减轻梗死后的心肌重塑。患者PCI治疗出院后,提倡进行康复治疗,经过几个月的体力锻炼后,方能酌情恢复部分或轻工作,应避免过重的体力劳动和精神紧张,需要患者长期服用药物稳定自身情况。

《手术室人文护理与沟通技巧》由于瑞英,王亚玲,甘晓琴主编,重庆出版社2019年8月出版。本书从手术开始,详细的介绍了术前访视、术前转运、术前等待、术中配合、术后复苏、术后转运、术后回访、延续性护理等全方位的护理人文关怀行为细节和沟通技巧。内容新颖、实用性强、操作性强、不仅有利于提高患者的满意度,基本满足临床护理人员对护理相关技能的要求。出院后患者可在医生或康复师的指导下,在家中选择一些简单有效的方法进行康复训练,如洗漱、梳头等自理活动或干一些轻体力家务活。此时延续性护理的新模式出现解决了这一大难题,不仅包括在院期间,还可以深入患者生活。这并不是护理人员对患者的直接护理,而是通过各种手段使患者能够更好的实现自我护理。尤其对于心肌梗死患者,在PCI后注意事项多,恢复周期长,并且在不良习惯下还易复发,此时延续性护理就显得尤为重要,包括制定出院计划、康复计划、指导过渡期的合理饮食、指导术后用药的用法用量、不良反应等等,可以使患者更好的回归生活,存在积极的临床作用。急性心梗患者PCI出院后延续性护理的具体方式,患者于出院第1、2、5月每月进行一次家庭随访,一次随访约半小时。指导饮食习惯,急性心肌梗死患者PCI术后需要服用抗血小板药、他汀类、钙通道阻滞剂等多种药物,此时应完全掌握患者所需相关药物种类、名称、患者服用剂量、包括药物相关知识,并指导患者正确用药。PCI后患者对于自身状况不了解,对于PCI技术也所知甚少,这种不确定的情况会使患者心理压力过重,应及时同患者和家属交流,对患者紧张心态及时进行疏导,指导患者选择喜欢的方式舒缓心情。建立互联网联系平台,不定期进行医学知识宣讲,可通过线上解决患者疑问。在延续护理干预中患者可以通过多种方式咨询出院后的任何自身问题,医生也可以实时掌握患者的病情变化,对其做出正确引导,在随访过程中给患者提供了有针对性、个性化、人性化的康复教育,为患者用药的连续、安全提供了保障,真正的参与到了患者从入院治疗到恢复出院再到康复的全过程。延续性护理干预使医生不再只是负责院内救助的传统角色,作为出院后的延伸,走到了每一个患者的生活中去,有效的提高了患者服药的依从性、减少患者焦虑心情、对疾病的自我护理能力、改善患者生活质量、减少心肌梗死的再发率,对心肌梗死患者康复存在积极意义。

《手术室人文护理与沟通技巧》本书以手术室日常工作为主线,详细介绍了住院手术、门急诊手术、日间手术患者的术前访视、术前转运、术前等待、术中配合、术后复苏、术后转运、术后回访与延续性,将手术室护理与人文科学充分结合,提高患者的满意度。延续性护理等临床护理过程中全方位的护理人文关怀行为细节及护患沟通技巧。更充分体现了护理人员的自身价值,从长远看对整个医疗环境的改善都有着积极的影响。

(作者熊晓波,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)