

表儿茶素对脂多糖诱导 BALB/c 小鼠急性肺损伤的非靶向代谢组学研究*

李泽林, 王秋婷, 付晓萍, 谷大海, 王雪峰, 普岳红, 葛长荣, 范江平**

(云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】研究表儿茶素(EC)对小鼠急性肺损伤(ALI)炎症反应的调节作用。【方法】采用吸入式气管滴注法在 BALB/c 小鼠中建立 ALI 模型, H&E 染色观察肺组织病理学变化, 并结合基于超高效液相色谱与四极杆—飞行时间质谱联用技术(HILIC UHPLC-Q-TOF MS)的非靶向代谢组学方法对小鼠肺组织进行研究。【结果】对比空白对照组, LPS 处理后的小鼠肺组织发生严重的炎症变化, 而 EC 预处理组炎症现象比 LPS 组轻。经肺组织代谢轮廓分析发现: 二十羟基花生四烯酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、ATP、磷酸胆碱、二十碳四烯酸、磷酸、烯醇和二磷酸葡萄糖等差异物与小鼠急性肺损伤内源性代谢密切相关, 且涉及甘油酯代谢、糖酵解、甘油磷脂代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、抗坏血酸代谢和胆碱代谢等 6 条代谢路径。【结论】运用代谢组学方法探讨了 EC 干预小鼠 ALI 的差异代谢物变化情况, 为表儿茶素抗炎特性的研究提供了理论依据。

关键词: 表儿茶素; 脂多糖; 急性肺损伤; 非靶向代谢组学; 超高效液相色谱与四极杆—飞行时间质谱联用技术
中图分类号: R 285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X(2020)05-0852-10

Non-targeted Metabonomics Study of Epicatechin on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in BALB/c Mice

LI Zelin, WANG Qiuting, FU Xiaoping, GU Dahai, WANG Xuefeng,

PU Yuehong, GE Changrong, FAN Jiangping

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To study the regulatory effect of epicatechin (EC) on the inflammation of acute lung injury (ALI) in mice. [Method] A suction-type tracheal instillation method was used to establish ALI model in BALB/c mice. The histopathological changes were observed, based on the non-target metabonomics methods by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HILIC UHPLC-Q-TOF MS) were studied on lung tissue. [Result] Compared with the control group, significant inflammatory changes were observed in lung tissue of mice treated with lipopolysaccharide (LPS), however, it was slight in pretreatment EC group. Metabolic profile analysis of lung tissue demonstrated that 20-hydroxy arachidonic acid, tryptophan, phenylalanine, tyrosine, ATP, choline, 20-tetradecenoic acid, phosphoric acid, enol, and glucose diphosphate were closely related to endogenous metabolism in ALI of mice. They might in-

收稿日期: 2019-09-25

修回日期: 2020-04-24

网络首发时间: 2020-09-22 15:36:08

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31560457); 云南农业大学发展基金(KX900002)。

作者简介: 李泽林(1995—), 男, 云南临沧人, 在读硕士研究生, 主要从事食品科学研究。

E-mail: 1054994094@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 范江平(1972—), 男, 湖南汝城人, 博士, 教授, 主要从事食品科学与功能性食品研究。E-mail: 1993033@ynau.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200922.0808.001.html>



volve six metabolic pathways such as glyceride metabolism, glycolysis, phospholipid metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, ascorbic acid and metabolism, and choline metabolism. [Conclusion] The study investigated the mechanism of effect of epicatechin intervention on ALI by non-targeted metabonomics method, which provided a theoretical basis for anti-inflammatory property of epicatechin.

Keywords: epicatechin; lipopolysaccharide (LPS); acute lung injury; non-targeted metabonomics; quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HILIC UHPLC-Q-TOF MS)

表儿茶素(epicatechin, EC)是一种天然植物黄烷醇类化合物,分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$,呈白色晶体,易溶于甲醇和水,与表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和儿茶素没食子酸酯(CG)合称为儿茶素类化合物^[1]。它在葡萄、红葡萄酒、茶、某些可可粉和巧克力等食品中的含量较高,许多研究表明:表儿茶素对人体健康有益,归因于它的抗氧化和抗炎的作用^[2-3]。表儿茶素的抗氧化活性已有大量报道,以茶叶里的表儿茶素抗氧化活性的报道见多。和抗氧化效果相比,其抗炎效果及机理的研究仍像谜团^[4],其在调节炎症中的机制尚不清楚。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种肺组织内部或者外部引起的一类肺部炎症反应^[5]。ALI会导致毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞出现异常,最终导致患者出现呼吸衰竭等现象^[6-7]。ALI的发病机制尚未被完全阐明,所以致死率较高,目前较为有效的方法是机械通气,但容易对肺组织造成二次伤害^[8]。有研究表明一些天然黄酮类提取物能有效调节小鼠急性肺损伤。LAN等^[9]发现红景天甙能够降低急性肺损伤小鼠TNF- α 、NO和IL-6等促炎因子的含量;SHI等^[10]发现芦丁、绿原酸和阿魏酸等组成的注射液能通过参与小鼠脂肪酸代谢、氨基酸代谢、嘌呤代谢和磷脂代谢等代谢通路调节小鼠急性肺损伤。表儿茶素作为黄酮类化合物之一,具有抗炎的效果,但其在干预脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤炎症的研究鲜有报道,通过非靶向代谢组学方法检测其肺组织内代谢物变化的研究也很少。非靶向代谢组学(untargeted metabonomics)是尽可能多地定性和相对定量生物体系中的代谢物,最大程度反映总的代谢物信息^[11-12]。针对生物样本中小分子代谢物种类多、极性跨度大和浓度动态范围大的特点,色谱—质谱联用技

术已成为代谢组学研究最重要的工具^[13]。

本研究采用吸入式气管滴注法^[14]建立小鼠急性肺损伤模型,H8LE染色观察其病理组织变化,然后基于超高效液相色谱与四极杆—飞行时间质谱联用技术(HILIC UHPLC-Q-TOF MS)的非靶向代谢组学分析探讨表儿茶素对急性肺损伤小鼠模型中的肺组织内源代谢物的变化,以分析表儿茶素调节小鼠急性肺损伤的作用机制,为今后表儿茶素的抗炎研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠急性肺损伤模型建立

SPF级BALB/c雄性小鼠36只(20~30 g/只)于2018年10月23日购于昆明医科大学,许可证编号SCXK(滇)k2015—0002。自由进食和饮水,调节室温(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(50 ± 5)%,12 h光照和12 h黑暗环境,适应性饲养7 d后进行试验,过程严格按照《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定执行。BALB/c小鼠随机分为空白对照(CK)组、脂多糖(LPS)(北京索莱宝科技有限公司,中国)模型组和表儿茶素(EC)(纯度 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司,中国)预处理组,每组12只。试验开始前4 h禁食和禁水,EC预处理组以每只40 mg/kg的剂量对小鼠进行腹腔注射EC,以相同剂量给LPS模型组和CK组腹腔注射生理盐水,1 h后给LPS组和EC预处理组采用吸入式气管滴注法滴注LPS[10 mg/(mL·只)]。4 h后用乙醚迷晕小鼠,立即颈椎脱臼处死小鼠,每组随机取6只小鼠,用固定液将其肺组织下叶固定24 h,剩余组织与另外6只小鼠的肺组织立即冻于液氮中,随后转至 -80°C 冰箱待用。

1.2 肺组织病理形态观察

将固定24 h的肺组织脱水,然后进行石蜡包埋、切片、苏木精伊红(H8LE)染色和封片;正

置光学显微镜 (Nikon Eclipse E100, 日本) 观察小鼠肺下叶的组织病理形态。

1.3 肺组织匀浆制备

取每组 6 只完整的肺组织样品, 每只称 60 mg, 加 200 μ L 水匀浆, 涡旋震荡 60 s, 然后加入 800 μ L 乙腈 (Merck, 1499230—935, 德国) 和甲醇溶液 (1 : 1, *V/V*) 混匀, 低温超声 2 次, 每次 30 min, -20°C 下静置 1 h 沉淀蛋白, 低温高速离心机 (Eppendorf 5430R, 德国) 4°C 离心 ($14\ 000\times g$, 20 min), 取上清液后, 真空冷冻干燥, -80°C 冰箱储存待用。加 100 μ L 乙腈水溶液 (1 : 1, *V/V*) 复溶, 4°C 离心 ($14\ 000\times g$, 15 min), 取上清液进行质谱分析。

1.4 色谱、质谱条件

用超高压液相色谱仪 (Agilent 1290 Infinity LC, 美国) 进行样品色谱分离, 色谱柱 (Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide $1.7\ \mu\text{m}$, $2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$ column, 美国) 柱温: 25°C , 进样量: 2 μ L, 流速: 0.3 mL/min; 流动相 A: 水+25 mmol/L 乙酸铵 (Sigma, 70221, 美国) +25 mmol/L 氨水; 流动相 B: 纯乙腈。样品经 UHPLC 分离后采用 Triple TOF 5600+质谱仪 (AB SCIEX, 美国) 进行电喷雾电离 (ESI) 正、负离子两种模式质谱分析, 电喷雾电离条件: 离子源气体 1 : 60, 离子源气体 2 : 60, 温度: 600°C , 正、负两种模式下电压为 $\pm 5\ 500\ \text{V}$; 质量扫描范围为 m/z : 60~1 000 Da, 一级扫描范围为 25~1 000 Da, 扫描时间 0.2 s; 采用高灵敏度模式进行二级质谱, 正、负两种模式下去簇电压为 $\pm 60\ \text{V}$, 高碰撞能为 $(35\pm 15)\ \text{eV}$ 。

1.5 潜在差异代谢物筛选鉴定、KEGG 代谢通路及富集分析

采用 XCMS 程序进行峰面积提取、峰对齐和保留时间校正, 去除组别总和大于 2/3 的离子峰; 然后对 QC 样品进行 Pearson 相关性分析和多变量控制 (MCC), 并对总体样本进行 Hotellings T2 分析。用 SIMCA-P 14.1 模式识别, 然后进行多维统计分析 [无监督主成分分析 (PCA) 分析、有监督偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)] 和单维统计分析 (*t* 检验和变异倍数分析)。

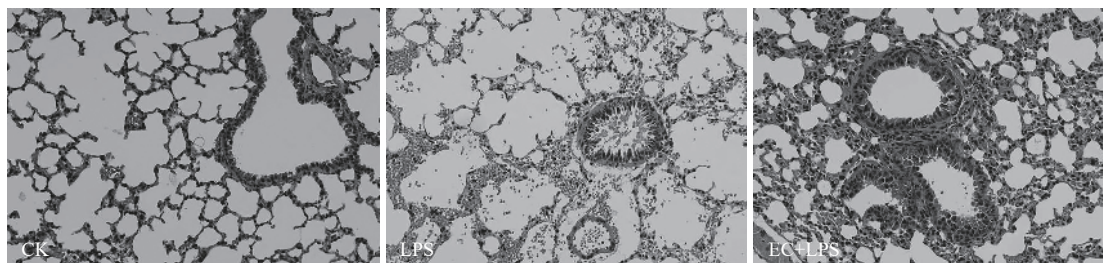
1.6 代谢组学数据处理与分析

运用 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 鉴定差异代谢物结构和化学式, 再通过 Fisher 精确检验 (Fisher's Exact Test) 分析和计算各通路代谢物富集度的显著性水平 ($P<0.05$), 确定信号转导途径。

2 结果与分析

2.1 组织病理学结果分析

由图 1 可知: 空白对照组小鼠肺泡充盈结构正常, 肺泡壁薄、间隔无肿胀, 气管紧致无渗出物, 无炎症改变; LPS 组肺组织结构遭到破坏, 肺泡壁变薄, 肺泡融合、塌陷形成肺大泡, 气管内有大量红细胞及渗出物, 并且伴有炎性细胞浸润, 表现出炎症症状; EC 预处理组 (EC+LPS) 与 LPS 组相比, 肺泡结构明显更正常, 炎性细胞侵入少, 气管内出血和渗出现象更少或不明显, 肺泡内部干净透亮, 但是肺泡间质变宽肿胀, 总体上看肺部炎症现象比 LPS 组更轻。



注: CK. 空白对照组; LPS. 脂多糖诱导模型组; EC+LPS. 表儿茶素预处理+LPS 诱导组; 下同。

Note: CK. blank control group; LPS. LPS induced model group; EC+LPS. EC pretreatment+LPS induced group; the same as below.

图 1 BALB/c 小鼠肺组织病理变化

Fig. 1 Pathological change in BALB/c mice lung tissue

2.2 色谱、质谱与多维统计分析

对质控 (QC) 小鼠肺组织样本进行色谱检测分析, 得到其色谱图 (图 2)。正、负离子模式

下, QC 样本中各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠, 说明试验过程中由仪器误差引起的变异较小。

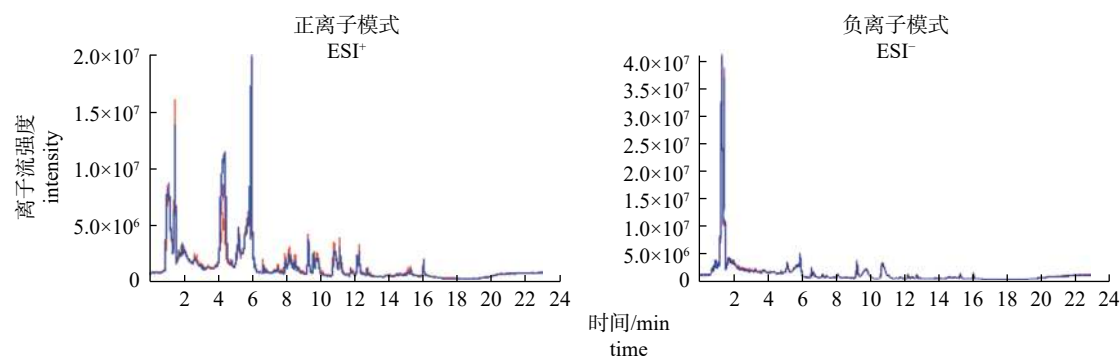


图2 正离子模式 (ESI⁺) 和负离子模式 (ESI⁻) 下 QC 样本代谢组学总离子流色谱图 (TIC) 分析

Fig. 2 Total ion current chromatogram (TIC) for the metabonomic analysis in QC samples in positive ion mode (ESI⁺) and negative ion mode (ESI⁻)

在确定试验 QC 样本后, 分别对 LPS 组和 EC+LPS 组样品进行色谱检测分析 (图 3)。结果显示: 不同试验组峰型和峰数量存在一定的差异, 证明各组小鼠体内代谢受到明显干扰。

对 QC 样品进行 Pearson 相关性分析, 相关系数均大于 0.9, 样品的相关性好; 多变量控制 MCC 中 QC 样本都控制在正、负 3 个标准差范围内波动, 仪器波动较小 (图 4)。

正、负离子模式下代谢物的离子峰数目分别为 7193 和 6364, 经 7 次循环交互验证得到的正、负离子模式下 PCA 得分图, 且 QC 样本聚集在一起 (图 5)。总体样本经 Hotellings T2 分析显示:

全部在 99% 置信区间内, 没有离群样本存在 (图 6)。总样本经 PLS-DA 分析显示: 在正负离子模式下, LPS 组与 EC+LPS 组分离良好, 却又各成一簇, 证明 PLS-DA 模型稳定可靠 (图 7)。

2.3 差异代谢物的筛选及鉴定

以变量权重值大于 1 为筛选标准, 筛选出差异代谢物。在正、负离子模式下分别筛选出 19 种和 7 种差异代谢物。正离子模式显著差异代谢物为 5'-三磷酸腺苷 (ATP)、DL-2 磷酸、磷酸烯醇、1-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、吲哚和 5-甲基胞苷 6 种, 负离子模式显著差异代谢物为甘油 3-磷酸、L-古洛糖酸-γ-内酯和尿苷二磷酸葡萄糖

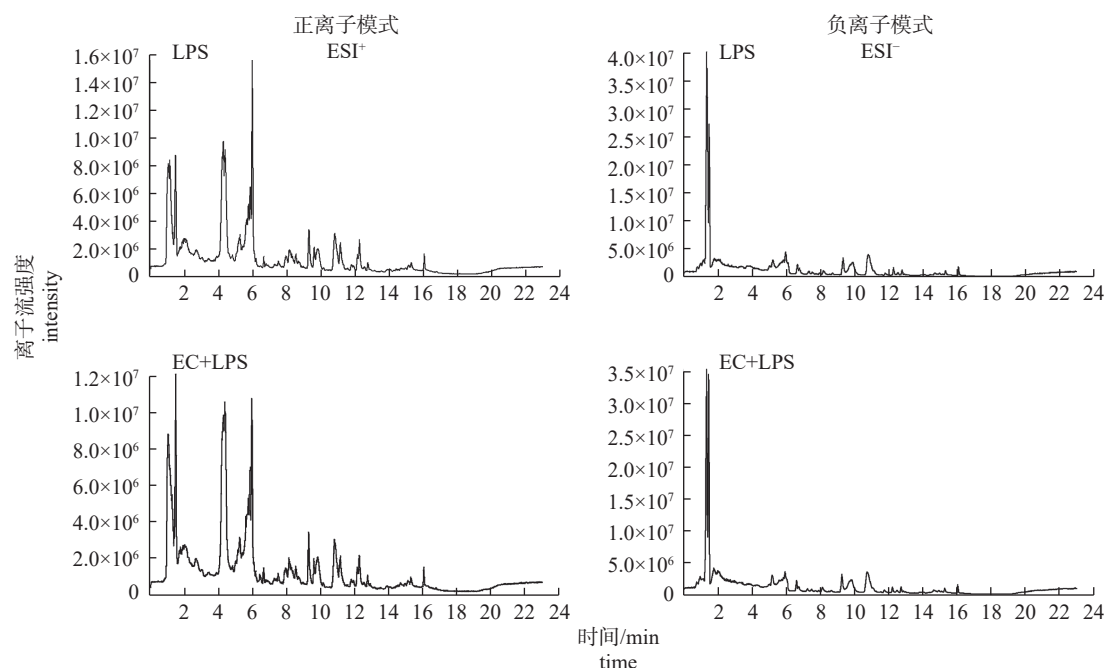


图3 LPS 组和 EC+LPS 组 BALB/c 小鼠肺组织样品代谢组学离子流色谱图 (TIC) 分析

Fig. 3 Sample ion current chromatogram for the metabonomic analysis in BALB/c mice tissue among LPS and EC+LPS group

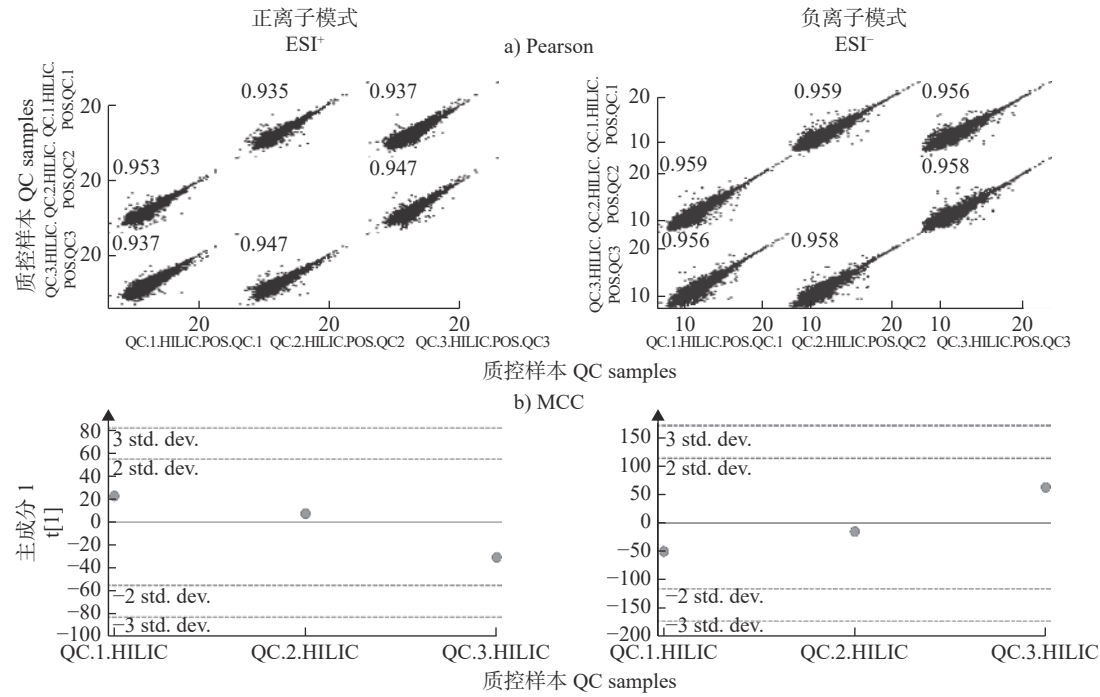


图 4 BALB/c 小鼠肺组织 QC 样本 Pearson 相关性分析和 MCC 分析

Fig. 4 Pearson correlation analysis and MCC in BALB/c mice tissue among QC samples

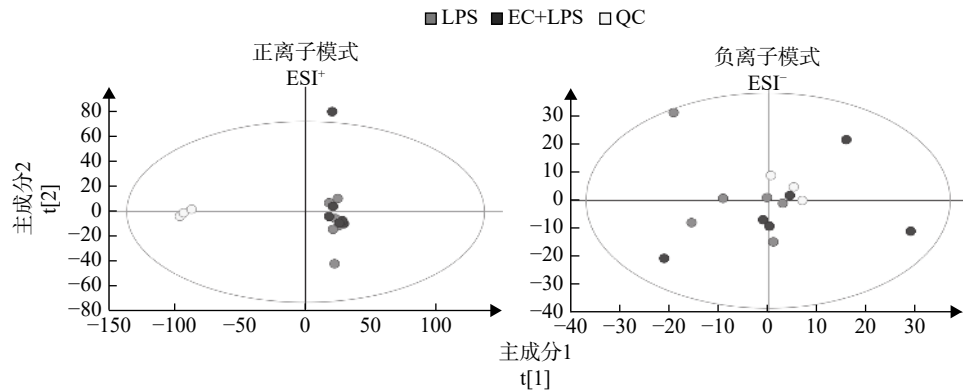


图 5 正、负离子模式下 QC 样本、LPS 组和 EC+LPS 组肺组织代谢组学分析主成分得分图

Fig. 5 PCA score plots of issue metabolic profiling among QC, LPS, EC+LPS groups in ESI⁺ and in ESI⁻

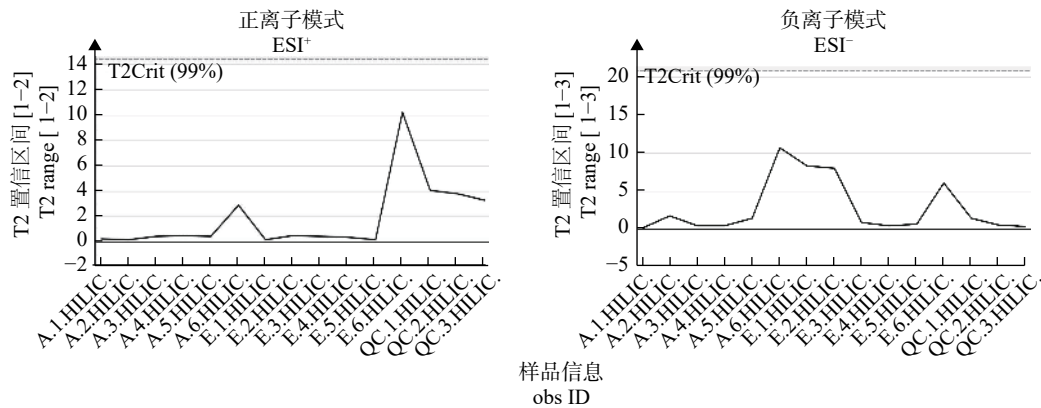


图 6 正、负离子模式下 QC 样本、LPS 组和 EC+LPS 组肺组织 Hotellings T2 分析

Fig. 6 Hotellings T2 analysis of lung issue metabolic profiling among QC, LPS, EC+LPS groups in ESI⁺ and in ESI⁻

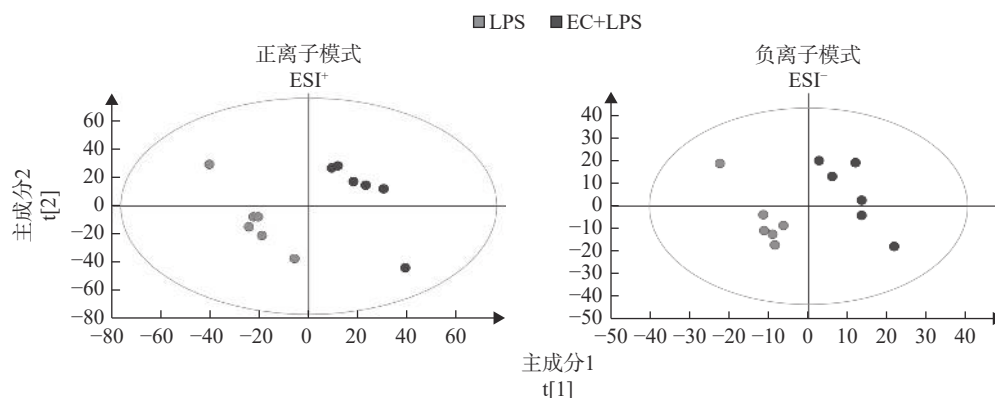


图7 正、负离子模式下 LPS 组和 EC+LPS 组肺组织代谢组学分析 PLS-DA 得分图

Fig. 7 PLS-DA score plots of tissue metabolic profiling among LPS, EC+LPS groups in ESI⁺ and in ESI⁻

糖 (UDP-D-葡萄糖) 3 种 (表 1)。其中, 5'-三磷酸腺苷 (ATP)、20-羟基花生四烯酸和 20-羟-20-烷四烯酸等差异代谢物在 LPS 组中下调, 但在 EC+LPS 处理组均上调。在差异代谢物分析中, LPS 组与 EC+LPS 组通过聚类各自出现在同一簇中, 热图分析结果表明: 各差异代谢物有良好的分类结果 (图 8)。

2.4 差异代谢物 KEGG 通路及 KEGG 通路富集分析

经 KEGG 数据库进行代谢通路进行分析, Fisher 精确检验分析计算后得到代谢物富集具有显著性差异的通路 (图 9)。鉴定出的代谢差异物的路径主要涉及甘油酯代谢、糖酵解、甘油磷脂代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、抗坏血酸代谢和胆碱代谢等, 这些代谢通路各有不同, 却又直接或间接相互关联 (图 10)。

3 讨论

本研究以吸入式气管滴注法给 BALB/c 小鼠滴注 LPS, 以建立急性肺损伤 (ALI) 模型, 小鼠肺组织病理学观察结果显示: 相比于空白对照组, LPS 处理后的小鼠肺组织发生了严重的炎症改变, 而表儿茶素 (EC) 预处理组小鼠肺组织内的炎症变化得到一定程度的抑制, 证明这种黄酮类物质 EC 能通过调节小鼠肺组织病理变化来改善炎症反应。

近几年来, 基于高通量数据研究平台的研究方法被广泛运用于炎症反应的研究, 特别是非靶向代谢组学方法在炎症肺损伤的研究运用越来越多, 且这类研究为炎症肺损伤诊断和治疗提供

了重要的理论依据^[15-16]。因此, 本研究基于 HIL-IC UHPLC-Q-TOF MS 非靶向代谢组学, 结合单变量和多变量数据分析方法^[17], 对 LPS 组和 EC 预处理组小鼠肺组织进行检测分析, 从小鼠机体内源性代谢物层面^[18-19]探究 EC 对 ALI 小鼠的作用机制。经研究发现: 在正离子模式下筛选出 19 种差异代谢物, 在负离子模式下筛选出 7 种差异代谢物, 他们可能是潜在的代谢标志物, 主要涉及二十羟基花生四烯酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、ATP、磷酸胆碱、二十碳四烯酸、磷酸、烯醇和二磷酸葡萄糖等。这些潜在的代谢标志物与炎症代谢路径直接或间接关联, 所以共同构成了 EC 调节 BALB/c 小鼠 ALI 的代谢网络^[20-21]。

有相关的研究报道: 内毒素导致的 ALI 小鼠机体会经历高动力和高代谢的过程, ATP 作为对机体提供能量的单位, 是参与这一过程的主要物质, LPS 刺激后其含量降低, 表明小鼠机体为了维持能量稳态而触发补偿机制^[22-25]。EC 预处理组小鼠体内 ATP 水平升高, 从而判定 EC 可以调节急性肺损伤导致的高代谢状态来维持能量输出的稳定。

花生四烯酸 (全顺式-5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸) 是生物机体内广泛存在的一种 ω -6 多不饱和脂肪酸^[26-27], 它参与多种炎症疾病的病理生理过程, 被普遍认为是体内重要的内源性介质之一^[28]。20-羟基花生四烯酸是花生四烯酸的一类代谢产物, 而 20-羟-20-烷四烯酸又是 20-羟基花生四烯酸的代谢产物^[29], LPS 组中小鼠的 20-羟基花生四烯酸和 20-羟-20-烷四烯酸代谢水平均有下调, 而 EC 预处理组这 2 个物质的代谢水平显

表 1 正、负离子模式下肺组织潜在生物标志物
Tab. 1 Potential biomarkers of lung tissue metabolite profiles in ESI⁺ and ESI⁻

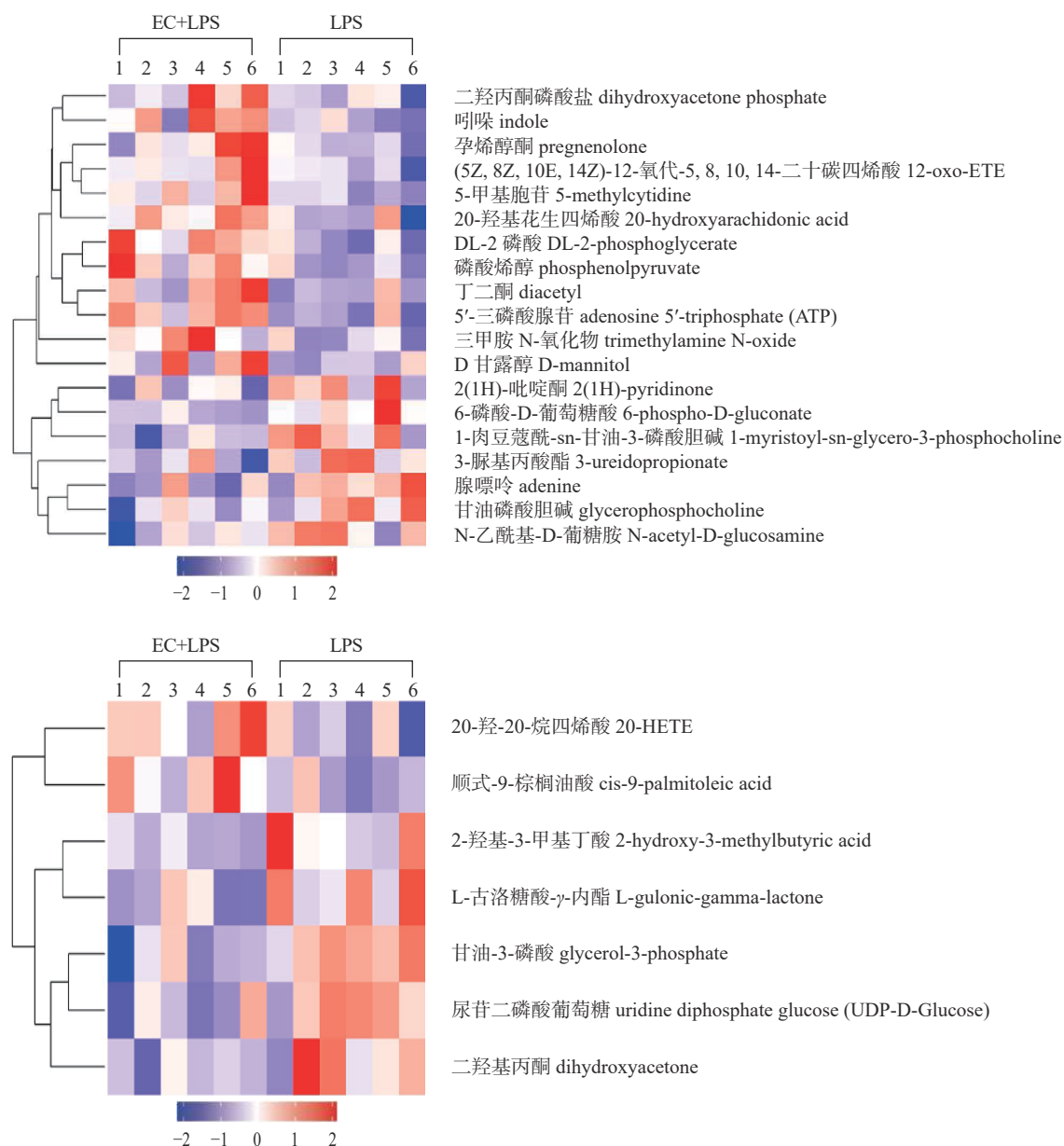
编号 No.	带电荷状态 adduct	代谢物 metabolites	质荷比 m/z	保留时间/s retention time	变异倍数 fold change	P值 P value	变化趋势 trend	
							LPS	LPS+EC
1	(M+H) ⁺	5'-三磷酸腺苷(ATP) adenosine 5'-triphosphate (ATP)	508.003 1	930.389	1.797 1	0.005 7	↓	↑
2	(M+H) ⁺	DL-2磷酸 DL-2-phosphoglycerate	186.999 5	900.482	1.773 5	0.011 6	↓	↑
3	(M+H) ⁺	磷酸烯醇 phosphoenolpyruvate	168.988 7	888.762	1.856 3	0.025 1	↓	↑
4	(M+Na) ⁺	1-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 1-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	490.291 5	361.315	0.674 1	0.025 7	↑	↓
5	(M+NH ₄) ⁺	吲哚 indole	135.090 8	363.734	1.254 1	0.032 0	↓	↑
6	(M+H) ⁺	5-甲基胞苷 5-methylcytidine	258.108 1	426.160	1.444 6	0.033 9	↓	↑
7	(M+NH ₄) ⁺	20-羟基花生四烯酸 20-hydroxyarachidonic acid	338.269 5	88.574	1.495 6	0.053 4	↓	↑
8	(M+CH ₃ COO+2H) ⁺	丁二酮 diacetyl	147.064 0	435.567	1.846 4	0.053 8	↓	↑
9	(M+H) ⁺	三甲胺 N-氧化物 trimethylamine N-oxide	76.074 9	624.539	1.866 3	0.065 0	↓	↑
10	(M+NH ₄) ⁺	(5Z,8Z,10E,14Z)-12-氧代-5,8,10,14- 二十碳四烯酸 12-oxo-ETE	336.253 6	87.351	1.567 7	0.068 2	↓	↑
11	(M+H-H ₂) ⁺	6-磷酸-D-葡萄糖酸 6-phospho-D-gluconate	259.020 9	803.229	0.705 3	0.070 7	↑	↓
12	M ⁺	D-甘露醇 D-mannitol	182.080 6	435.392	1.301 2	0.081 0	↓	↑
13	(M+H-H ₂) ⁺	N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	204.085 9	488.187	0.665 4	0.083 8	↑	↓
14	(M+H) ⁺	2 (1H)-吡啶酮 2 (1H)-pyridinone	96.042 7	119.739	0.678 2	0.084 3	↑	↓
15	(M+H) ⁺	腺嘌呤 adenine	136.060 6	295.901	0.633 9	0.086 7	↑	↓
16	(M+H) ⁺	3-脲基丙酸酯(3-UPA) 3-ureidopropionate	133.059 6	611.140	0.728 7	0.088 8	↑	↓
17	(M+H) ⁺	孕烯醇酮 pregnenolone	317.247 6	61.696	2.066 7	0.089 8	↓	↑
18	(M+Na) ⁺	二羟丙酮磷酸盐 dihydroxyacetone phosphate	192.986 5	835.765	1.354 4	0.095 0	↓	↑
19	M ⁺	甘油磷酸胆碱 glycerophosphocholine	258.110 1	735.409	0.792 8	0.097 8	↑	↓
20	(M-H) ⁻	甘油-3-磷酸 glycerol-3-phosphate	171.006 9	833.326	0.668 4	0.008 7	↑	↓
21	(M-H) ⁻	L-古洛糖酸-γ-内酯 L-gulonic-gamma-lactone	177.040 5	89.642	0.641 1	0.038 7	↑	↓
22	(M-H) ⁻	尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-D-葡萄糖) uridine diphosphate glucose (UDP-D-glucose)	565.047 6	863.444	0.630 4	0.040 4	↑	↓
23	(M-H) ⁻	顺式-9-棕榈油酸 cis-9-palmitoleic acid	253.217 6	82.388	1.468 0	0.051 9	↓	↑
24	(M-H ₂ O-H) ⁻	二羟基丙酮 dihydroxyacetone	71.013 4	363.025	0.562 8	0.059 4	↑	↓
25	(2M-H) ⁻	20-羟-20-烷四烯酸 20-HETE	639.462 7	88.298	1.773 3	0.063 9	↓	↑
26	(M-H) ⁻	2-羟基-3-甲基丁酸 2-hydroxy-3-methylbutyric acid	117.055 4	290.139	0.402 7	0.065 6	↑	↓

注: “↑”和“↓”表示上调和下调。
Note: “↑”and“↓” mean the compound is up-regulated and down-regulated.

著升高,表明 EC 对小鼠花生四烯酸代谢的次级代谢产物具有调控作用。

被筛选出的差异代谢物中,多数代谢物参与调控多条代谢通路,且在各个通路中起到不同的作用,利用通路富集分析可选择出有统计学意义

的代谢通路^[30]。本研究筛选出的显著差异代谢物 DL-2 磷酸、磷酸烯醇和吲哚主要参与糖酵解/糖异生、磷酸戊糖代谢通路、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸代谢、蛋白质的消化与吸收以及癌症中心碳代谢等代谢通路的



注: 每行代表一种代谢物, 每列代表表达水平 (红色: 上调; 蓝色: 下调)。

Note: Each row represents a metabolite and each column represents the expression level (red: up-regulated; blue: down-regulated).

图8 正、负离子模式下两组间热图可视化差异代谢物的表达水平

Fig. 8 Heat map visualization of the differential metabolites in these two groups in ESI⁺ and ESI⁻

调控, 经 LPS 诱导后这些代谢物在所参与的代谢通路中均呈现下调水平, 而 EC 预处理组均呈现上调趋势。甘油 3-磷酸、L-古洛糖酸-γ-内酯和尿苷二磷酸葡萄糖主要参与抗坏血酸代谢、半乳糖代谢、嘧啶代谢、甘油酯、甘油磷脂代谢、淀粉和蔗糖代谢、癌症中的胆碱代谢等代谢通路的调控, 经 LPS 诱导后这些代谢物在所参与的代谢通路中均有上调, 而 EC 预处理组均呈现下调趋势。这些差异代谢物所涉及的糖类、氨基酸类、

胆碱类和脂类等代谢都与炎症的调节有直接或间接的关联, 所以 EC 很可能是通过调节这几类物质的代谢来调节 LPS 诱导的 ALI。因此, 下一步将继续研究 EC 对 ALI 小鼠作用的代谢组学特征, 通过高、中、低剂量的 EC 干预来分析小鼠内源代谢物的变化, 并且扩大代谢物的检测范围, 进一步探究其在代谢通路中对小鼠炎症 ALI 的作用机制。

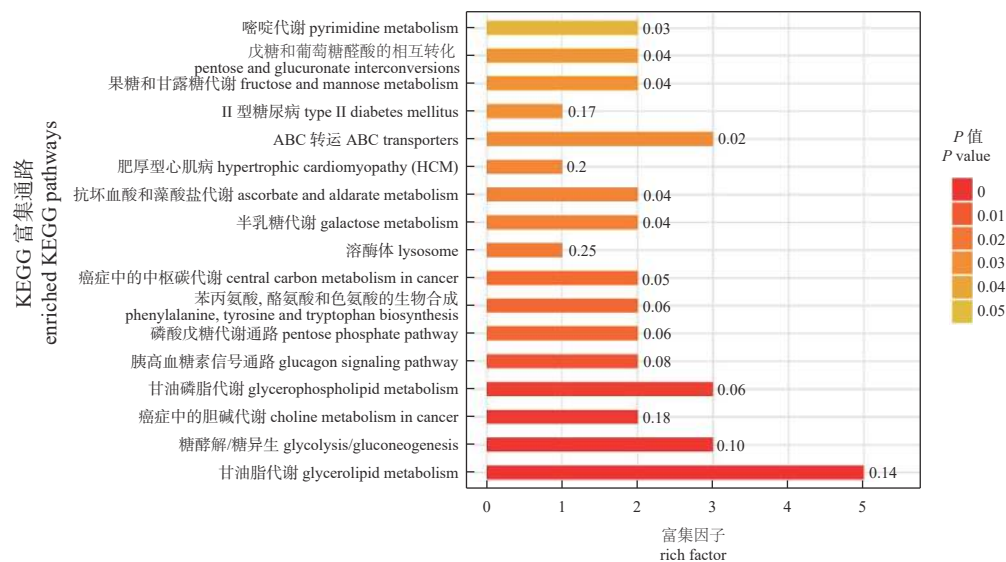


图 9 KEGG 通路富集结果

Fig. 9 KEGG pathway enrichment results

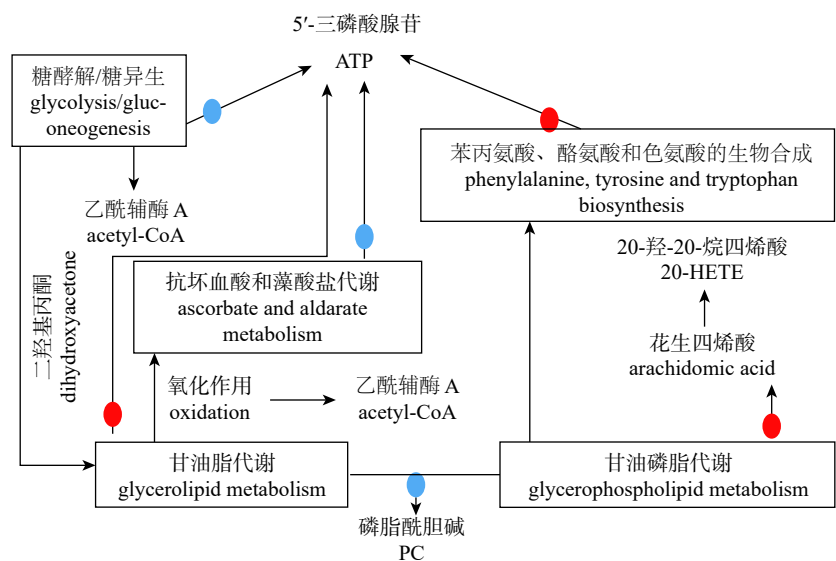


图 10 LPS 组和 EC+LPS 组差异代谢物相关通路图 (红色：上调，蓝色：下调)

Fig. 10 The metabolic pathway networks related to the different metabolites between LPS-induced ALI and LPS+EC groups (red in the networks are up-regulated and the blue ones are down-regulated)

[参考文献]

[1] 徐先祥. 儿茶素的药理作用研究综述 [J]. 郑州轻工业学院学报 (自然科学版), 2012, 27(4): 60. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1478.2012.04.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-1478.2012.04.016).

[2] CORCORAN M P, MCKAY D L, BLUMBERG J B. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety[J]. Journal of Nutrition for the Elderly, 2012, 31(3): 176. DOI: [10.1080/21551197.2012.698219](https://doi.org/10.1080/21551197.2012.698219).

[3] PELUSO I, RAGUZZINI A, SERAFINI M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF-alpha and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2013, 57: 784. DOI: [10.1002/mnfr.201200721](https://doi.org/10.1002/mnfr.201200721).

[4] RUIJTERS E J, HAENEN G R, WESELER A R, et al. The cocoa flavanol (-)-epicatechin protects the cortisol response[J]. Pharmacological Research, 2014, 79(1): 28. DOI: [10.1016/j.phrs.2013.11.004](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.004).

[5] BOSMANN M, GRAILER J J, RUEMMLER R, et al. Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury[J]. The FASEB Journal, 2013, 27(12): 5010. DOI: [10.1096/fj.13-236380](https://doi.org/10.1096/fj.13-236380).

[6] 刘舒洁. 急性肺损伤药物治疗研究进展 [J]. 中国处方药, 2018, 16(6): 20. DOI: [10.3969/j.issn.1671-945X.2018.06.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-945X.2018.06.012).

- [7] XU L Q, YU X T, GUI S H, et al. Protective effects of Li-Fei-Xiao-Yan prescription on lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the TLR4/NF- κ B pathway[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017: 1791789. DOI: [10.1155/2017/1791789](https://doi.org/10.1155/2017/1791789).
- [8] 黄涛. 机械通气肺损伤机制及防治新进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(12): 2173. DOI: [10.3969/j.issn.1006-2084.2014.12.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-2084.2014.12.023).
- [9] LAN K C, CHAO S C, WU H Y, et al. Salidroside ameliorates sepsis-induced acute lung injury and mortality via downregulating NF- κ B and HMGB1 pathways through the upregulation of SIRT1[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 12026. DOI: [10.1038/s41598-017-12285-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12285-8).
- [10] SHI X, CHEN G N, WEI J, et al. UHPLC-Q-TOF MS-based metabolic analysis for the therapeutic efficacy of "Xuebijing Injection" against sepsis-induced acute lung injury[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018: 8514619. DOI: [10.1155/2018/8514619](https://doi.org/10.1155/2018/8514619).
- [11] 范仕成, 高悦, 张慧贞, 等. 非靶向和靶向代谢组学在药物靶点发现中的应用 [J]. 药学进展, 2017(4): 263.
- [12] CAJKA T, FIEHN O. Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(1): 524. DOI: [10.1021/acs.analchem.5b04491](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491).
- [13] 熊喜悦, 盛小奇, 王华, 等. 代谢组学气相色谱-质谱分析方法中样品衍生化技术的新进展 [J]. 化学通报 (印刷版), 2015, 78(7): 602.
- [14] 晋乐飞, 吴卫东, 张巧, 等. 吸入式气管滴注法的建立 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2015(1): 75. DOI: [10.13705/j.issn.1671-6825.2015.01.021](https://doi.org/10.13705/j.issn.1671-6825.2015.01.021).
- [15] DE PRETER V. Metabolomics in the clinical diagnosis of inflammatory bowel disease[J]. Digestive Diseases, 2015, 33(S1): 2. DOI: [10.1159/000437033](https://doi.org/10.1159/000437033).
- [16] ANET A, SOUBIERES, ANDREW POUILLIS. Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease[J]. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology & Therapeutics, 2016, 7(1): 41. DOI: [10.4292/wjgpt.v7.i1.41](https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i1.41).
- [17] SANDS B E. Biomarkers of inflammation in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2015, 149(5): 1275. DOI: [10.1053/j.gastro.2015.07.003](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.003).
- [18] 夏天一, 陈旭娇, 张凤, 等. 基于靶向代谢组学的腹膜透析患者血清氨基酸水平探究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(4): 374. DOI: [10.13286/j.cnki.chinhosp Pharmacology.2018.04.06](https://doi.org/10.13286/j.cnki.chinhosp Pharmacology.2018.04.06).
- [19] 夏国斌. 典型儿茶素和茶黄素分离分析及其缓解雌性 db/db 小鼠代谢综合征的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [20] AURICH M K, FLEMING R M T, INES T. Metabo tools: a comprehensive toolbox for analysis of genome-scale metabolic models[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7: 327. DOI: [10.3389/fphys.2016.00327](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00327).
- [21] 魏玉芬. 黄连解毒汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠的保护作用及其代谢组学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [22] 张文辉, 左丽娜, 孙思, 等. 热毒宁调节 MCMV 感染的肺炎模型小鼠肺组织内 IFN- γ 和 IL-4 水平的研究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(9): 1730. DOI: [10.3969/j.issn.1004-745X.2016.09.027](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-745X.2016.09.027).
- [23] 郭争鸣, 陈懿, 刘惠君, 等. 金纳多对内毒素诱导小鼠急性肺损伤保护作用机制的初步研究 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(4): 277. DOI: [10.3969/j.issn.1673-2588.2009.04.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-2588.2009.04.001).
- [24] 姚金福, 樊湘泽, 杨子尧, 等. 葛根芩连汤对内毒素诱导的急性肺损伤小鼠的保护机制 [J]. 中国老年学杂志, 2015(7): 1899. DOI: [10.3969/j.issn.1005-9202.2015.07.076](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9202.2015.07.076).
- [25] 王妍妍, 董艾莉, 张媛媛, 等. 氢对内毒素诱导人脐静脉内皮细胞损伤时线粒体动力学的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(2): 227. DOI: [10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2017.02.026](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2017.02.026).
- [26] 邸子真, 杨瑞, 吴怡, 等. 浊点萃取结合 LC-MS/MS 法测定野鸢尾黄素对气道炎症模型豚鼠体内花生四烯酸的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(9): 1932. DOI: [10.13192/j.issn.1000-1719.2017.09.051](https://doi.org/10.13192/j.issn.1000-1719.2017.09.051).
- [27] EIJKELKAMP B A, BEGG S L, PEDERICK V G, et al. Arachidonic acid stress impacts pneumococcal fatty acid homeostasis[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 813. DOI: [10.3389/fmicb.2018.00813](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00813).
- [28] 吴迪. 促炎症消退脂质介质对干眼性别特异性及对眼表炎症消退调控的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2015.
- [29] 贾蝉忆, 贺滢, 陈远寿, 等. 20-羟二十烷四烯酸在高血压发生中的作用及机制研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(36): 85. DOI: [10.3969/j.issn.1002-266X.2018.36.025](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-266X.2018.36.025).
- [30] ZHANG X, MARDINOGLU A, JOOSTEN L A B, et al. Identification of discriminating metabolic pathways and metabolites in human PBMCs stimulated by various pathogenic agents[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 139. DOI: [10.3389/fphys.2018.00139](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00139).

责任编辑: 何馨成