

盐酸班布特罗改善慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的作用机制研究[△]

杜孟皎*, 钟艳梅, 邓善滨, 余楚钦#, 陈莉诗, 蔡延渠(广东药科大学新药研发中心/广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006)

中图分类号 R285.5; R563.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)05-0564-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.05.12

摘要 目的:研究盐酸班布特罗对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠的改善作用机制,并寻找潜在的生物标志物。方法:将30只大鼠随机分为正常组、模型组和盐酸班布特罗组(3.3 mg/kg),每组10只。模型组、盐酸班布特罗组大鼠采用烟熏联合脂多糖滴注法建立COPD模型。造模成功后,盐酸班布特罗组大鼠灌胃相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天给药1次,连续给药45 d。末次给药后,采集各组大鼠血清样品及肺泡灌洗液,采用酶联免疫吸附法检测肺泡灌洗液中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;采用液质联用(LC-MS)技术检测血清代谢物并进行代谢组学分析。采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法筛选并鉴定差异代谢物,再结合相关文献找出潜在生物标志物,并利用MetPA分析平台对其进行代谢通路富集分析。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,盐酸班布特罗组大鼠肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。代谢组学、OPLS-DA结果显示,共发现21个差异代谢物,其中12个为潜在生物标志物(包括马来酰丙酮酸、羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛等),且盐酸班布特罗可显著降低马来酰丙酮酸、甲基砒代半胱氨酸、5-脱氧-D-葡萄糖醛酸等标志物的水平($P<0.05$),升高羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛、丙二酸等标志物水平($P<0.05$);生物标志物主要富集于戊糖磷酸途径、乙醛酸和三羧酸代谢通路,其次富集于肌醇磷酸代谢通路、精氨酸与酪氨酸代谢通路和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路。结论:盐酸班布特罗改善COPD的机制可能与降低细胞调节因子IL-6、TNF- α 水平有关,还可能与氨基酸代谢、能量代谢、脂质代谢等通路有关。

关键词 盐酸班布特罗;慢性阻塞性肺疾病;机制;生物标志物;代谢组学;液质联用;大鼠

Study on the Mechanism of Bambuterol Hydrochloride in the Improvement of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats

DU Mengjiao, ZHONG Yanmei, DENG Shanbin, YU Chuqin, CHEN Lishi, CAI Yanqu (New Drug Research and Development Center of Guangdong Pharmaceutical University & Guangdong Provincial Key Laboratory of New Dosage Form, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of Bambuterol hydrochloride in the improvement of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model rats, and to find the potential biomarker. METHODS: Totally 30 rats were randomly divided into normal group, model group and bambuterol hydrochloride group (3.3 mg/kg), with 10 rats in each group; COPD model was established by lipopolysaccharide (LPS) infusion combined with smoking in model group and bambuterol hydrochloride group. After modeling, bambuterol hydrochloride group was given relevant medicine intragastrically, normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 45 d. After last medication, the serum sample and alveolar lavage fluid of rats were collected. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in alveolar lavage fluid were detected by ELISA. The serum metabolites were detected by LC-MS and analyzed by metabolomics. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was used to screen out the differential metabolites. The potential biomarkers were identified based on the related literature, and the metabolic pathway enrichment analysis was carried out by MetPA analysis platform. RESULTS: Compared with normal group, the levels of IL-6 and TNF- α in alveolar lavage fluid of rats were increased significantly in model group ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of IL-6 and TNF- α in alveolar lavage fluid of rats were decreased significantly in bambuterol hydrochloride group ($P<0.05$). Results of metabolomics and OPLS-DA showed that 21 differential metabolites and 12 potential biomarkers were found (including maleylpyruvate, hydroxypyruvate, tartronate semialdehyde, etc.). Bambuterol hydrochloride can significantly reduce the levels of maleylpyruvate, methylselenocysteine and

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81503260);广东省科技厅-广东省中医药科学院联合科研项目(No.2016A020226038)

* 硕士研究生。研究方向:新药研发与转化。E-mail:15225955073@163.com

通信作者:高级工程师,硕士生导师。研究方向:药物新剂型的开发。E-mail:pn333@163.com

5-deoxy-D-glucuronic acid ($P<0.05$), while increase the levels of hydroxypyruvate, tartronate semialdehyde and malonic acid ($P<0.05$). These biomarkers were mainly concentrated in pentose phosphoric acid pathway, glyoxylic acid and tricarboxylic acid metabolism pathway, followed by inositol phosphoric acid metabolism pathway, arginine and

tyrosine metabolism pathway, glycine, serine and threonine metabolism pathway. CONCLUSIONS: The mechanism of bambuterol hydrochloride improving COPD may be associated with the decrease of the levels of TNF- α and IL-6, as well as the pathway of amino acid metabolism, energy metabolism and lipid metabolism.

KEYWORDS Bambuterol hydrochloride; Chronic obstructive pulmonary disease; Mechanism; Biomarkers; Metabolomics; LC-MS; Rat

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的以持续气流受限为特征的慢性炎症性疾病^[1-4]。COPD是呼吸系统的常见病和多发病,多发于老年人,目前全球40岁以上成年人中至少有10%患有COPD,已成为世界上第四大死因^[5]。COPD患病率高、病程长,发作期与缓解期呈交替进行,最终导致呼吸残疾,严重影响患者的劳动能力和生活质量,增加沉重的社会经济负担,已成为一个重要的公共卫生问题^[6]。

盐酸班布特罗是肾上腺素 β_2 受体激动剂的前体药物,能够对支气管平滑肌产生松弛作用,能够很好地改善COPD^[7],但其治疗COPD的机制尚不明确。近年来,代谢组学的研究不断发展,不仅成为后基因组学时代最重要的组学技术之一,亦成为最重要的系统生物学科^[8]。为了进一步了解盐酸班布特罗治疗COPD的作用机制,本课题组通过烟熏联合脂多糖滴注法构建COPD大鼠模型,然后给予盐酸班布特罗进行干预,利用液质联用(LC-MS)技术分析盐酸班布特罗对COPD作用的潜在生物标志物,从代谢网络层面阐明盐酸班布特罗治疗COPD的作用机制,以期进一步了解COPD的病理生理过程,并为早期诊断、病情监测及盐酸班布特罗的疗效评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器

400 L烟熏箱(课题组自制);SKJ.MHP型麻醉咽喉镜(泰兴市斯美特医疗器械有限公司);Nexera X2型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Triple TOF 5600+型质谱(MS)仪(美国Sciex公司);Multiskan FC型酶标仪、HERA型CO₂细胞培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];CX41型光学显微镜(日本奥林巴斯有限公司);Buxco PFT型实验动物肺功能检测系统(美国DSI公司);ALLEGRA X-30R型离心机(美国Beckman Coulter公司);1-16K型高速低温离心机(德国Sigma公司);XW-80A型涡旋混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸班布特罗片(齐鲁制药有限公司,批号:7K0091D28、8C0011D28,规格:10 mg);椰树牌香烟(广东中烟工业有限责任公司);脂多糖(美国Sigma公司,批号:057M4013V);生理盐水(江西科伦药业有限公司,批

号:C18100104);水合氯醛(天津市大茂化学试剂厂,批号:20171215);大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:569180906)、大鼠白细胞介素6(IL-6)ELISA试剂盒(批号:385180906)均购自天津安若瑞康生物技术有限公司;无水乙醚(广州化学试剂厂,批号:20180901);甲醇、甲酸和乙腈为色谱纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠30只,雄性,体质量180~220 g,购自南方医科大学实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(粤)2017-0125。大鼠于温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度(50 \pm 5)%、12 h光照/12 h黑暗交替的环境下进行饲养。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 盐酸班布特罗灌胃溶液的制备 将盐酸班布特罗片研磨成细粉,精密称取适量细粉于锥形瓶中,加水超声(功率:350 W,频率:35 kHz)10 min,制成质量浓度为0.33 mg/mL的盐酸班布特罗灌胃溶液(以主药计),备用。

2.1.2 脂多糖溶液的制备 精密称取适量脂多糖于10 mL离心管中,加生理盐水涡旋溶解,制成质量浓度为1 mg/mL的脂多糖溶液,备用。

2.1.3 水合氯醛溶液的制备 精密称取适量水合氯醛于50 mL离心管中,加水涡旋溶解制成10%水合氯醛溶液,备用。

2.2 分组、造模与给药

将30只SD大鼠适应性饲养3 d后,将大鼠随机分为正常组、模型组和盐酸班布特罗组(3.3 mg/kg,以主药计,根据人临床有效剂量换算而得),每组10只。模型组、盐酸班布特罗组采用烟熏联合脂多糖滴注法^[9]复制COPD大鼠模型:将大鼠每天定时在烟熏箱内用香烟烟熏,每天3次,每次30 min,烟熏间隔1 h;同时,分别于烟熏第1、14天定时用10%水合氯醛(0.95 mL/300 g)麻醉,仰卧位固定大鼠,暴露声门,将喉镜轻轻插入喉口,再将静脉套管针快速插入气管,拔出针芯,用注射器滴注1 mg/mL脂多糖溶液0.2 mL,然后将大鼠固定板直立旋转,使药物均匀散布于大鼠两肺。正常组大鼠正常饲养,不烟熏,滴注时以等体积生理盐水代替。以肺功能检测及肺泡灌洗液生化指标等作为COPD造模成功的

指标^[9]。造模成功后,对模型组及盐酸班布特罗组大鼠每天继续用香烟持续烟熏,每天2次,每次30 min,每次烟熏间隔4 h;同时,盐酸班布特罗组大鼠灌胃相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃等体积的生理盐水,每天1次,连续给药45 d。

2.3 肺泡灌洗液的制备与相关指标的检测

各组随机抽取6只大鼠,腹腔注射10%水合氯醛深度麻醉后,颈椎脱臼处死,剪开颈部皮肤,暴露气管,从气管小口处用6 mL生理盐水灌洗右肺2次,回抽收集肺泡灌洗液。将肺泡灌洗液于4℃下以1 000 r/min离心15 min,取上清液,按IL-6、TNF- α ELISA试剂盒说明书的相关操作,检测IL-6、TNF- α 水平。

2.4 血样采集及处理

末次给药结束后,各组大鼠禁食24 h,然后以乙醚麻醉,于眼眶后静脉丛取血3 mL至离心管中,室温静置1 h,待凝固分层后,在4℃下以12 000 r/min离心10 min,取上清液,备用。

2.5 LC-MS法检测大鼠血清中的代谢产物

2.5.1 色谱与质谱条件 (1)色谱条件。色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.5 μ m);正离子流动相为含0.1%甲酸的水溶液(A)-乙腈(B);负离子流动相为含5 mmol/L乙酸铵的水溶液(A)-乙腈(B);柱温为50℃;流速为0.5 mL/min;进样体积为2 μ L。正、负离子梯度洗脱条件均为0~1 min, 2%B; 1~13 min, 2%B→90%B; 13~16 min, 90%B; 16~16.1 min, 90%B→2%B; 16.1~20 min, 2%B。(2)质谱条件。样品质谱信号采集分别用正、负离子模式扫描模式,毛细管电离电压为3.0 kV;取样锥孔电压为27 eV;萃取锥孔电压为4 eV;离子源温度为120℃;脱溶剂温度为500℃;脱溶剂氮气流速为600 L/h;锥孔反吹氮气流速为50 L/h。

2.5.2 样品的制备与检测 吸取血清样品40 μ L加入96孔板中,再加入甲醇120 μ L,封膜后振荡1 min,置于-20℃冷冻30 min后,在4℃下以4 000 r/min离心20 min。吸取上清液25 μ L至96孔板中,加入225 μ L 50%甲醇稀释,混合均匀,按“2.5.1”项下色谱与质谱条件进样分析。

2.6 数据采集与分析

2.6.1 差异代谢物的筛选及鉴定 为了区分正常组与模型组、模型组与盐酸班布特罗组血清样品中代谢物之间的差异,减少与研究目的不相关的生物学差异和样本处理分析过程中的偏差,本文采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。将LC-MS数据文件(.raw)使用MasslynxV 4.1数据软件转换为开放数据格式文件(.csv),得到保留时间、质荷比(m/z)、峰面积的数据矩阵后,导入SIMCA-P 14软件进行代谢组学分析。分别对正、负

离子模式下的数据进行OPLS-DA分析。评价数据模型的参数有 R^2Y 和 Q^2 ,其中 R^2Y 表示所建模型对 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力。一般情况下, R^2Y 和 Q^2 大于0.5时,即可认为该模型可接受,其值越接近1代表模型拟合越准确、模型可靠性越高^[10]。再将 m/z 数据输入京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<https://www.kegg.jp/>)查询差异代谢物。

为了更直观展示差异代谢物及对其进行差异代谢物的筛选,本文运用 T 检验和变异倍数分析得出差异倍数(Fold change)和 Q 值(Q -value)2个指标,通常将差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 、 Q 值 ≤ 0.05 作为筛选差异代谢物的标准^[11]。结果以火山图(差异倍数的对数 \log_2 差异倍数为横坐标, Q 值的负对数 $-\log_{10}Q$ 为纵坐标)形式呈现,表示其同一类样本间的重复性是否良好。

2.6.2 潜在生物标志物通路分析 通过查找相关资料^[12-18],找出差异性代谢物中与COPD疾病相关的潜在生物标志物。为研究潜在生物标志物所涉及的代谢途径及各潜在生物标志物之间的相互作用关系,利用MetPA分析平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>)对最终得到的潜在生物标志物进行代谢通路富集分析^[19]。将血清中的潜在生物标志物导入MetaboAnalyst 4.0软件分析,横坐标为代谢通路影响值,纵坐标为 $-\log_{10}P$,表示得到的代谢通路富集分析的显著性水平。横、纵坐标值越大,颜色越深,圆圈越大,则与代谢通路的相关性越大^[20]。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行数据分析。各项指标结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据进行正态性检验及方差齐性检验后使用单因素方差分析,组间两两比较采用Dunnett或Dunnett's T_3 方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 水平的测定结果

与正常组比较,模型组大鼠肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸班布特罗组大鼠肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6水平显著降低($P < 0.05$),详见表1。

表1 各组大鼠肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

Tab 1 The levels of IL-6 and TNF- α in BALF of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	TNF- α
正常组	145.85 \pm 18.64	92.54 \pm 3.94
模型组	172.77 \pm 4.05*	103.29 \pm 1.92*
盐酸班布特罗组	158.08 \pm 8.70 [#]	91.55 \pm 5.71 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.2 大鼠血清中代谢产物的LC-MS分析结果

各组大鼠血清样品在正、负离子模式下的总离子流图见图1。由图1可知,各组大鼠血清中代谢产物存在差异。

3.3 差异代谢物的筛选及鉴定分析结果

3.3.1 OPLS-DA分析结果 各组大鼠血清代谢物的OPLS-DA分析结果见图2。

由图2可见,在正、负离子模式下,正常组和模型组

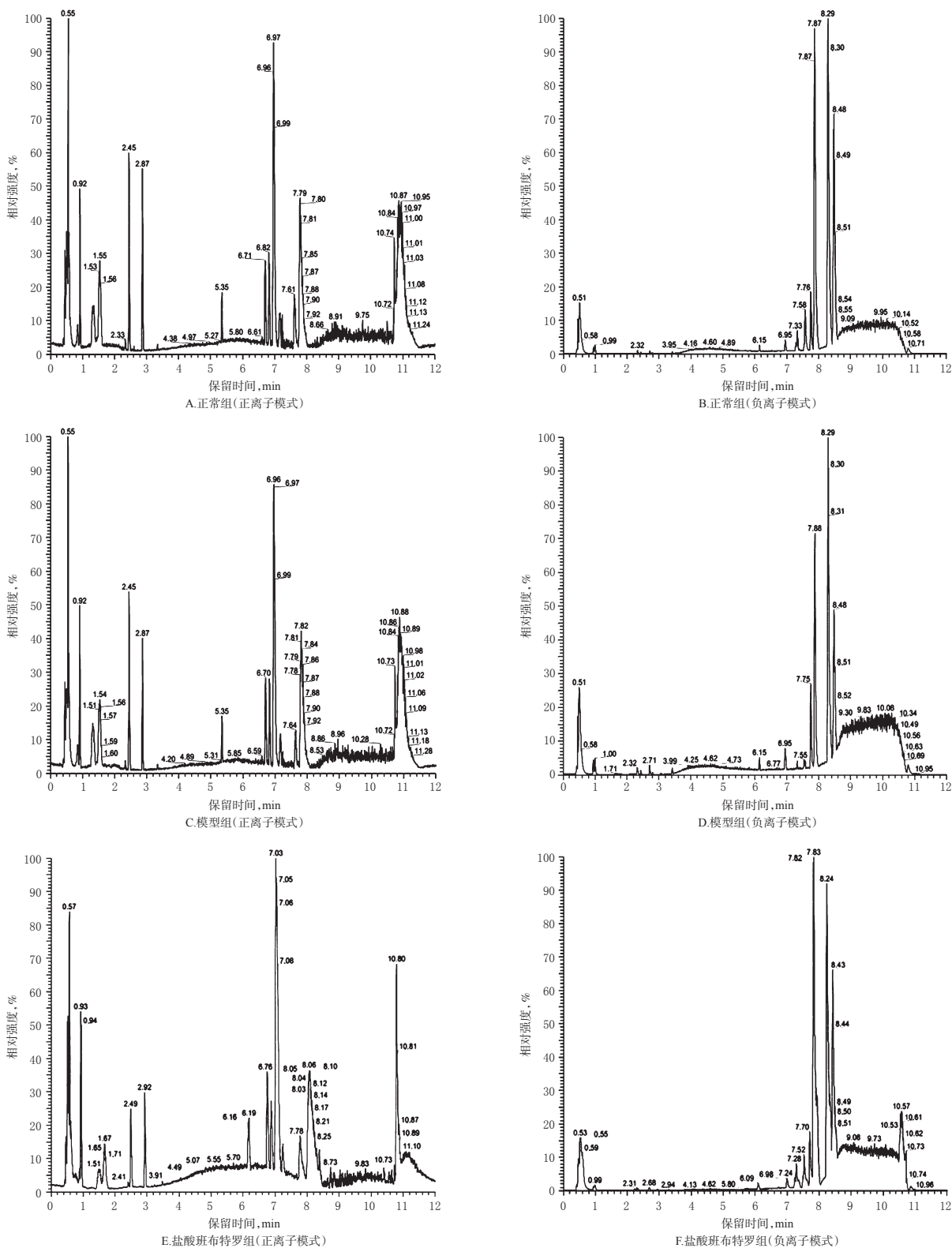


图1 各组大鼠血清样品在正、负离子模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion current chromatograms in serum of rats from different groups under positive and negative ion mode

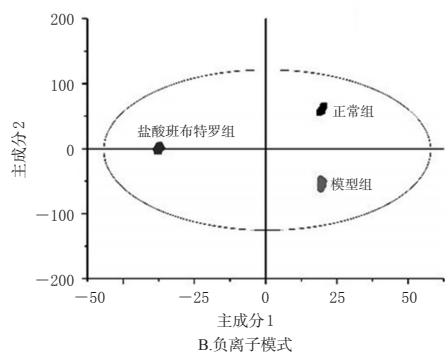
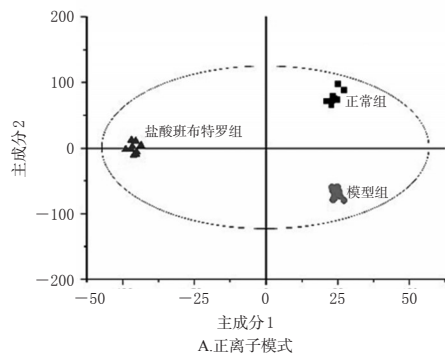


图2 各组大鼠血清代谢物的OPLS-DA分析结果

Fig 2 OPLS-DA analysis results in serum of rats in each group

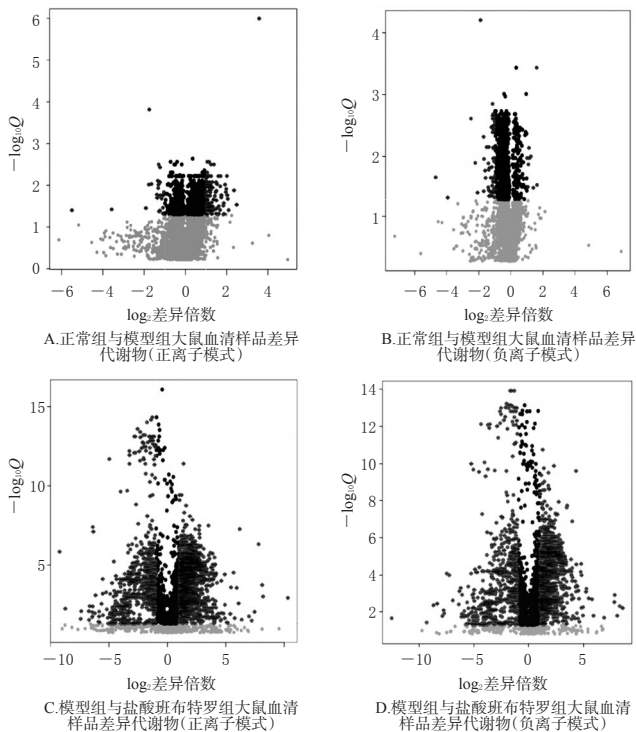
在 $t[1]$ 维均能完全分开,说明烟熏联合脂多糖法诱导COPD后大鼠血清代谢产物发生了显著的改变,表明COPD模型成功建立;模型组和盐酸班布特罗组在 $t[1]$ 维可以完全分开,说明盐酸班布特罗给药后COPD模型大鼠血清中的代谢产物发生了显著改变;同时,盐酸班布特罗组在 $t[2]$ 维向正常组靠近,说明盐酸班布特罗可使COPD大鼠血清代谢产物趋于正常值。OPLS-DA分析结果显示,正离子模式下 $R^2Y=0.99, Q^2=0.727$;负离子模式下 $R^2Y=0.997, Q^2=0.676$ 。

3.3.2 火山图分析结果 正常组与模型组、模型组与盐酸班布特罗组大鼠血清样品差异代谢物火山图结果见图3。

3.3.3 差异代谢物分析结果 基于“3.3.1”“3.3.2”项下结果,共发现21个差异代谢物,包括马来酰丙酮酸、羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛、丙二酸、脲甲酸、芥子气、*D*-4-羟基-2-酮戊二酸、4-羟基-2-氧代戊二酸、2-肌醇、2-酮基-3-脱氧-*D*-葡萄糖酸、葡萄糖酸内酯、5-脱氢-2-脱氧-*D*-葡萄糖酸、2*D*-2,3,5/4,6-五羟基环己酮、5-脱氧-*D*-葡萄糖醛酸、*L*-半乳糖-1,4-内酯、*L*-古洛糖酸- γ -内酯、2-脱氢-3-脱氧-*D*-半乳糖酸酯、2-脱氢-3-脱氧-*L*-半乳糖酸酯、3-富马酰基丙酮酸、甲基硒代半胱氨酸、*L*-抗坏血酸-6-磷酸盐,详见表2。

3.4 潜在生物标志物通路分析

3.4.1 潜在生物标志物 根据“3.3”项下筛选的差异代



注:浅灰色的点表示 $Q \geq 0.05$;黑色的点表示差异倍数在0.5~2.0之间且 $Q \leq 0.05$;深灰色的点表示差异倍数 ≤ 0.5 或 ≥ 2.0 且 $Q \leq 0.05$

Note: light gray points indicate that $Q \geq 0.05$; black points indicate that the fold change between 0.5 and 2.0 and $Q \leq 0.05$; dark gray points indicate that the fold change ≤ 0.5 or ≥ 2.0 and $Q \leq 0.05$

图3 各组大鼠血清样品差异代谢物火山图

Fig 3 Volcanic maps of differential metabolites in serum of rats in each group

表2 差异代谢物鉴定结果

Tab 2 Results of differential metabolite identification

编号	差异代谢物名称	m/z	保留时间,s	分子式
1	马来酰丙酮酸	185.118 0	196.232	$C_5H_6O_5$
2	羟基丙酮酸	105.066 8	348.704	$C_3H_4O_4$
3	羟基丙二酸半醛	105.066 8	348.704	$C_3H_4O_4$
4	丙二酸	105.066 8	348.704	$C_3H_4O_4$
5	脲甲酸	105.066 8	348.704	$C_2H_3N_2O_3$
6	芥子气	160.075 3	200.985	$C_2Cl_2H_4S$
7	<i>D</i> -4-羟基-2-酮戊二酸	163.097 4	1.60735	$C_5H_8O_6$
8	4-羟基-2-氧代戊二酸	163.097 4	525.270	$C_5H_8O_6$
9	2-肌醇	179.092 2	630.438	$C_6H_{12}O_6$
10	2-酮基-3-脱氧- <i>D</i> -葡萄糖酸	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
11	葡萄糖酸内酯	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
12	5-脱氢-2-脱氧- <i>D</i> -葡萄糖酸	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
13	2 <i>D</i> -2,3,5/4,6-五羟基环己酮	179.092 2	630.438	$C_6H_{12}O_6$
14	5-脱氧- <i>D</i> -葡萄糖醛酸	179.117 4	630.438	$C_6H_{10}O_6$
15	<i>L</i> -半乳糖-1,4-内酯	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
16	<i>L</i> -古洛糖酸- γ -内酯	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
17	2-脱氢-3-脱氧- <i>D</i> -半乳糖酸酯	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
18	2-脱氢-3-脱氧- <i>L</i> -半乳糖酸酯	179.092 2	630.438	$C_6H_{10}O_6$
19	3-富马酰基丙酮酸	187.143 6	166.618	$C_7H_{10}O_6$
20	甲基硒代半胱氨酸	199.107 2	154.911	$C_3H_7NO_3Se$
21	<i>L</i> -抗坏血酸-6-磷酸盐	257.112 3	141.040	$C_6H_8O_6P$

谢物并结合相关参考文献,共鉴定出12个潜在生物标志物(如马来酰丙酮酸、羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛等)。结果,盐酸班布特罗可显著降低马来酰丙酮酸、甲基硒代半胱氨酸、5-脱氧-D-葡萄糖醛酸等标志物的水平,升高羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛、丙二酸、脲甲酸、2-肌醇、2-酮基-3-脱氧-D-葡萄糖酸、葡萄糖酸内酯、5-脱氢-2-脱氧-D-葡萄糖酸、2D-2,3,5/4,6-五羟基环己酮的水平。盐酸班布特罗对COPD模型大鼠的潜在生物标志物的影响见表3。

表3 盐酸班布特罗对COPD模型大鼠的潜在生物标志物的影响

Tab 3 Effect of bambuterol hydrochloride on potential biomarkers in COPD model rats

序号	潜在生物标志物	m/z	Fold change 值	变化趋势	
				盐酸班布特罗组与模型组比较	模型组与正常组比较
1	马来酰丙酮酸	185.118 0	0.217	↓*	↑*
2	羟基丙酮酸	105.066 8	149	↑*	↓*
3	羟基丙二酸半醛	105.066 8	149	↑*	↓*
4	丙二酸	105.066 8	149	↑*	↓*
5	脲甲酸	105.066 8	149	↑*	↓*
6	甲基硒代半胱氨酸	199.107 2	0.111	↓*	↑*
7	2-肌醇	179.092 2	2.79	↑*	↓*
8	2-酮基-3-脱氧-D-葡萄糖酸	179.092 2	2.79	↑*	↓*
9	葡萄糖酸内酯	179.092 2	2.79	↑*	↓*
10	5-脱氢-2-脱氧-D-葡萄糖酸	179.092 2	2.79	↑*	↓*
11	2D-2,3,5/4,6-五羟基环己酮	179.092 2	2.79	↑*	↓*
12	5-脱氧-D-葡萄糖醛酸	179.117 4	0.321	↑*	↓*

注:“↑”表示上升,“↓”表示下降;与模型组比较,* $P<0.05$;与正常组比较, $P<0.05$

Note:“↑” means the content is up-regulated,“↓” means the content is down-regulated; vs. model group,* $P<0.05$; vs. control group, $P<0.05$

3.4.2 潜在生物标志物的代谢通路分析 盐酸班布特罗改善COPD模型大鼠的代谢通路主要富集在戊糖磷酸途径、乙醛酸和二羧酸代谢通路,其次富集于肌醇磷酸代谢通路、精氨酸和酪氨酸代谢通路和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路。潜在生物标志物的代谢通路分析结果见图4。

4 讨论

本研究以COPD模型大鼠作为研究对象,应用LC-MS技术对大鼠血清样本进行代谢组学分析,最终共筛选出12个潜在生物标志物。研究结果表明,羟基丙酮酸、羟基丙二酸半醛、丙二酸、脲甲酸、2-肌醇、2-酮基-3-脱氧-D-葡萄糖酸、葡萄糖酸内酯、5-脱氢-2-脱氧-D-葡萄糖酸、2D-2,3,5/4,6-五羟基环己酮和5-脱氧-D-葡萄糖醛酸的相对含量较正常组显著下降,马来酰丙酮酸和甲基硒代半胱氨酸物质较正常组显著升高,给予盐酸班布特罗片后上述物质的相对含量均较模型组显著上升或下降,显示盐酸班布特罗片可以改善代谢功能。

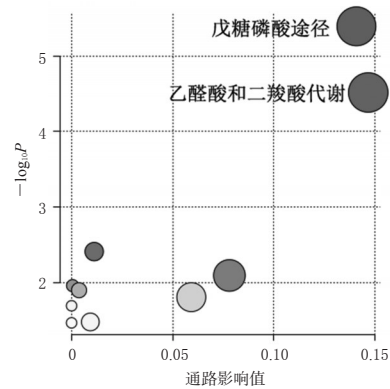


图4 潜在生物标志物的代谢通路分析结果

Fig 4 Analysis results of metabolic pathways of potential biomarkers

核转录因子- κ B(NF- κ B)和酪氨酸激酶-转录因子(JAK-STAT)信号通路是参与COPD炎症发生的相关通路,其中IL-6可诱导STAT3的过度表达^[12]。由于JAK-STAT信号通路的存在,多种细胞因子会与受体结合^[13],与受体耦连的JAKs激酶聚集,导致周围的JAKs互相磷酸化后被激活;激活后的JAKs磷酸化受体上的酪氨酸位点使受体与STATs结合,从而发生磷酸化;磷酸化后的STATs家族成员形成二聚体进入细胞核,与核内特异的DNA序列结合参与基因转录,发挥生物学效应^[14-15],且此过程与炎症反应密切相关。与空白组比较,模型组大鼠肺泡灌洗液中IL-6和TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$),推测可能是因为IL-6诱导STAT3的过度表达,增强了大鼠体内炎症反应;给予盐酸班布特罗干预后,大鼠肺泡灌洗液中2种因子水平显著下降,推测该药是通过调节细胞因子TNF- α 和IL-6水平对COPD炎症起到调节作用。

相关研究发现,COPD患者肌肉能量代谢受到干扰^[16]。羟基丙酮酸、丙二酸、2-酮基-3-脱氢-D-葡萄糖酸和葡萄糖酸内酯是参与糖的有氧氧化和无氧氧化的重要物质^[17]。本研究结果显示,羟基丙酮酸、丙二酸、2-酮基-3-脱氢-D-葡萄糖酸和葡萄糖酸内酯在盐酸班布特罗干预后均显著升高($P<0.05$),说明盐酸班布特罗可改善机体能量代谢,达到提供能量的作用。

5-脱氢-2-脱氧-D-葡萄糖酸、2D-2,3,5/4,6-五羟基环己酮、5-脱氧-D-葡萄糖醛酸和2-肌醇与肌醇磷酸代谢密切相关,磷酸肌醇代谢与血管平滑和呼吸肌有关;脲甲酸参与精氨酸的合成,精氨酸能够增强呼吸肌力、调节细胞免疫功能,还能以一氧化氮前体的形式来降低肺循环阻力^[18]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组中上述5种物质水平均显著下降($P<0.05$),推测这是由于抑制了磷酸肌醇代谢途径,使每一步代谢物的含量都有所减少;同时精氨酸的合成被抑制,增强了COPD肺循环阻力。与模型组比较,盐酸班布特罗组上述5种物

质水平均显著升高($P<0.05$),说明盐酸班布特罗促进了肌醇磷酸代谢,进而调节COPD引起的呼吸紊乱。

综上所述,盐酸班布特罗改善COPD的作用机制除可能与抑制细胞调节因子IL-6、TNF- α 水平有关外,还可能与氨基酸代谢、能量代谢、脂质代谢等通路有关。

参考文献

- [1] BIANCO A, MAZZARELLA G, TURCHIARELLI V. Adiponectin: an attractive marker for metabolic disorders in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. *Nutrients*, 2013, 5(10):4115-4125.
- [2] TSAROUCHA A, DANIL Z, MALLIF, et al. Leptin, adiponectin, and ghrelin levels in female patients with asthma during stable and exacerbation periods[J]. *J Asthma*, 2013, 50(2):188-197.
- [3] 刘文先,高振,木合塔尔·阿尤甫,等.基于中国不同地区流行病学调查的慢性阻塞性肺疾病患病因素分析[J]. *医学综述*, 2013, 19(7):1243-1246.
- [4] 谢文英,尚立芝,潘晓丽,等.爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能、血气指标及病理变化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(22):117-122.
- [5] LOZANOL R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859):2095-2128.
- [6] 李泽庚,刘志刚,徐彬,等.慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气虚证及其中药干预的尿液代谢组学研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(2):138-141.
- [7] 白容,刘俊.金咳息胶囊联合班布特罗治疗老年慢性阻塞性肺疾病缓解期的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(5):1111-1115.
- [8] 于栋华,宋明洋,王霄阳,等.穿山龙提取物抗急性痛性关节炎的尿液代谢组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20192346>.
- [9] 余常辉,陈燕,李婷,等.烟熏联合脂多糖气管内滴注建立原发性高血压大鼠慢性肺阻模型[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(9):1341-1346.
- [10] 杨虹,彭芳,刘刚,等.基于脂类代谢组学研究对乙酰氨基酚对小鼠药物性肝损伤的早期毒性[J]. *中国药房*, 2019, 30(15):2031-2036.
- [11] 陈静.基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术探究血液中与CRC诊疗以及预测卡培他滨不良反应相关的内源性代谢物[D].宜春:宜春学院,2019.
- [12] 丛文娟,鲁静,项水英,等.慢性阻塞性肺疾病炎症相关信号通路作用的研究进展[J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(3):305-310.
- [13] O'SHEA JJ, SCHWARTZ DM, VILLARINO AV, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66(1):311-328.
- [14] CLARKE D, DAMERA G, SUKKAR MB, et al. Transcriptional regulation of cytokine function in airway smooth muscle cells[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(5):436-445.
- [15] MORALES JK, FALANGA YT, DEPCRYNSKI A, et al. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway[J]. *Genes Immun*, 2010, 11(8):599-608.
- [16] NAIMI AI, BOURBEAU J, PERRAULT H, et al. Altered mitochondrial regulation in quadriceps muscles of patients with COPD[J]. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2011, 31(2):124-131.
- [17] WANG C, LI JX, TANG D, et al. Metabolic changes of different high-resolution computed tomography phenotypes of COPD after budesonide-formoterol treatment[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017. DOI: 10.2147/COPD.S152134.
- [18] 李明霞,范春红,罗智聪,等. L-精氨酸对COPD患者心肺功能的影响[J]. *临床肺科杂志*, 2014, 19(8):1368-1370.
- [19] 杨绍杰.左归饮对D-半乳糖致亚急性衰老模型大鼠肾功能及尿液代谢组学的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2017.
- [20] 闫明亮,周玉枝,李明花,等.基于¹H-NMR代谢组学的黄芩醇提取物延长果蝇寿命研究[J]. *中草药*, 2016, 47(10):1714-1722.

(收稿日期:2019-09-24 修回日期:2019-12-24)

(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅