

基于脂质代谢网络的虎杖抗呼吸道合胞病毒肺炎代谢组学研究

谢 彤 杜丽娜 徐建亚 沈存思 汪受传 单进军

(南京中医药大学中医儿科学研究所,江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室,南京,210023)

摘要 目的:探讨虎杖用于干预呼吸道合胞病毒(RSV)诱导 BALB/c 小鼠肺炎的脂质代谢网络的变化。方法:选取 18 只 BALB/c 小鼠,随机分为空白组、RSV 肺炎组、虎杖组 3 组,RSV 肺炎组、虎杖组滴鼻给予 RSV 病毒诱导产生肺炎,虎杖组灌胃给予虎杖提取物给予治疗,空白对照组灌胃给予生理盐水作为对照。实验结束,取血浆测定其血浆中的脂质代谢物质。建立基于高效液相-线性离子阱-静电场轨道杂交质谱(HPLC-LTQ-Orbitrap-MS)的脂质代谢组学技术,表征 3 组小鼠血浆中脂质代谢轮廓的变化,通过单因素方差分析筛选差异性化合物($P < 0.05$),并对其差异化合物进行结构确定,阐明其可能调节的脂质代谢网络。结果:多变量数据统计结果显示,3 组小鼠的血浆脂质代谢轮廓区分明显,受调控的脂质分子主要为磷脂酰胆碱、三酰甘油成分和磷酸化神经酰胺。代谢通路分析结果显示,虎杖主要调节了磷脂代谢。结论:虎杖提取物通过调节磷脂代谢发挥抗 RSV 肺炎的作用。

关键词 脂质代谢组学;虎杖;呼吸道合胞病毒肺炎;液质联用

Metabonomics Study on the Effect of Polygonum cuspidatum Anti-respiratory Syncytial Virus(RSV) Basing on Lipid Metabolism

Xie Tong, Du Lina, Xu Jianya, Shen Cungi, Wang Shouchuan, Shan Jinjun

(Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Polygonum cuspidatum on the lipid metabolism changes of BALB/c mice caused by anti-respiratory syncytial virus. **Methods:** Eighteen BALB/c mice were grouped into three groups randomly, blank control group, RSV group, and Polygonum cuspidatum group. RSV group and Polygonum cuspidatum group were infected by RSV through nasal inhalation. Bland control group experienced intragastric administration of normal saline. Plasma were taken after the experiment to measure its lipid metabolism materials. And the lipids were extracted by Methyl tert-butyl ether(MTBE) and then were introduced into HPLC-LTQ-Orbitrap for lipidomic analysis. OPLS-DA model were calculated for cluster of the three groups, and discriminated lipids were detected by One Way ANOVA($P < 0.05$). The structure of the discriminated lipids were determined, explaining the regulation of lipid metabolism. **Results:** The score plot of the OPLS-DA model provided the obvious discrimination of the three groups, suggesting the lipid metabolism regulated were phosphatidylcholine, triacylglycerol and phosphorylated ceramide. The further One Way ANOVA analysis suggested that the levels of the lyso glycerophosphocholines(Lyso PCs) and phosphated ceramides were significantly decreased when RSV were inoculated intranasally, while the Polygonum cuspidatum can increased this changes. **Conclusion:** Polygonum cuspidatum potentiates the anti-RSV effect by regulating the lipid metabolism.

Key Words Lipidomic analysis; Polygonum cuspidatum; RSV Pneumonia; Liquid mass spectrometry

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.006

呼吸道合胞病毒(RSV)感染是小儿常见下呼吸道感染性疾病。研究数据表明,2005 年世界范围内感染 RSV 的儿童超过 3.38 千万例,其中至少有 6.6 万~19.9 万患儿死亡^[1]。目前,对于 RSV 肺炎的治疗尚无理想安全的药物。中医药治疗小儿肺炎,疗效明显,无不良反应。

虎杖为蓼科植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的干燥根茎和根,具有清热解毒、利湿活血、止咳化痰的功效。临床上通常作为配伍药物用于治疗小儿呼吸道感染性疾病。如南京中医药大学汪受传教授的清肺口服液,在麻黄杏仁甘草石膏汤的基础上加減药味,配伍虎杖,用于治疗小儿肺炎,疗效显著^[2]。虎杖中的主要成分白藜芦醇、虎杖

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81303295,81373688);江苏省自然科学基金青年基金项目(编号:BK20130959);江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:13KJB360005)

作者简介:谢彤(1985—),南京中医药大学助理研究员,研究方向:代谢组学与中医药,E-mail:sunnyxy11021@163.com

通信作者:单进军(1979—),南京中医药大学副研究员,研究方向:代谢组学与中医药,E-mail:dfsjj@163.com

苷,属于非黄酮类多酚类化合物,现代药理学实验结果表明非黄酮类多酚化合物发挥抗氧化、免疫调节、抗喘等生物活性^[3]。

脂质代谢组学是目前新兴的组学技术手段,许多疾病的发生发展与脂质代谢有着密不可分的联系。神经系统疾病如阿尔兹海默症患者体内缩醛磷脂(Plasmalogens)的代谢存在异常^[4],肝脏代谢性疾病如对乙酰氨基酚诱导产生的肝毒性伴随着明显的肉毒碱水平异常^[5]。近年来的研究也发现,呼吸系统疾病与脂质代谢存在密切联系^[6]。由于与中医药具有相似的整体性,近年来代谢组学在中医药研究中越来越受到重视^[7]。为了阐明虎杖对 RSV 感染的干预作用,我们通过建立脂质代谢组学分析测定方法,从脂质网络代谢角度阐明虎杖可能干预的机制。

1 材料

1.1 仪器与试剂 非靶标脂质成分的检测采用线性离子阱-高分辨静电场轨道杂交质谱(LTQ-Orbitrap XL, Thermo fisher, America),高效液相色谱仪(U3000, DIONEX, America),数据采集通过 Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48 软件(Thermo fisher, America);高速冷冻离心机(Beckman, America);SpeedVac 离心浓缩仪(Thermo fisher)。配制流动相和样品处理所用甲醇、乙腈均为质谱级(99.8%, Merck, Germany),脂质提取所用甲基叔丁基醚(Methyl tert-butyl ether, MTBE, ROE, America)、异丙醇为质谱级(99.8%, ROE, America),水为自制去离子水(Millipore, America)。

1.2 动物、细胞和病毒 清洁级 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,18 只,雌性,体重 16~18 g,许可证号为:SCXK(沪)2012-0002。人喉癌上皮细胞(Hep-2 细胞)由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。呼吸道合胞病毒 A 亚型 Log 株由武汉国家典型培养物保藏中心提供。

2 方法

2.1 药物的制备 虎杖购自安徽亳州中药饮片厂,批号为 111208。经南京中医药大学药学院刘圣金博士鉴定,符合 2015 年版《中华人民共和国药典》一部中相关规定。虎杖临床给药剂量为 0.25 g/kg,按照体表面积换算为小鼠的给药剂量为 2.25 g/kg, BALB/c 小鼠的灌胃剂量为 0.1 mL/10 g,因此虎杖的浓度为 0.225 g/mL。

虎杖提取物采用水提醇沉的提取方法。虎杖

40 g,400 mL 蒸馏水煎煮 2 次,合并两次药液,减压浓缩至 400 mL,放冷至 40 ℃ 以下,缓慢加入乙醇使得含醇量达到 70%,静置,滤过,减压回收乙醇至无醇味,定容至 178 mL,即药材的生药量为 0.225 g/mL。

2.2 病毒扩增及动物实验 病毒扩增参考文献^[8]。18 只 BALB/c 小鼠随机分成 3 组,正常组、RSV 感染组、虎杖组,每组 6 只,适应环境 7d 后开始正式实验。RSV 感染组和虎杖组滴鼻感染 RSV 病毒液 100 TCID₅₀ 50 μL/只,正常组滴鼻给予 50 μL/只无血清 DMEM 高糖培养基。连续滴鼻 3d,1 次/d。虎杖组首次滴鼻感染 2 h 后灌胃给予虎杖提取液,连续 6 d,1 次/d。正常组合模型组每天等量给予生理盐水。实验结束后取血,用于脂质代谢组学研究,肺组织用于病理切片实验。

2.3 脂质提取 20 μL 血浆加入 225 μL 预冷甲醇(含内标蛇床子素 1.125 μg)沉淀蛋白,涡旋 20 s,后用 1 mL 预冷的 MTBE 提取,涡旋 20 s,后加入 125 μL 水使其分层,4 ℃ 12 500 r/min 离心 5 min,取上层富含脂溶性的脂质成分 400 μL,于 SpeedVac 真空浓缩仪中挥干。挥干后的残余样品用甲醇/甲苯溶剂(v/v,9:1)60 μL 复溶,涡旋 5 min,4 ℃ 20 000 r/min 高速离心 5 min 后,取上清进样。

2.4 色谱分离条件和质谱检测条件 色谱分离条件:血浆中脂质成分的分离采用色谱柱 Kinetex C₁₈(2.1 mm×100 mm,2.6 μm),柱温设定为 55 ℃。流动相为 A 为水/异丙醇(v/v,80/20)含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸;流动相 B 为异丙醇/乙腈(v/v,90/10)含 5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸。流速:0.3 mL/min;采用梯度洗脱分离血浆中的脂质分子:0—1 min,30% B;2—7 min,30%~80% B;7—23 min,80%~90% B;23—24 min,90% B;24—30 min,90%~10% B。

质谱检测参数:采用电喷雾电离离子源(Electrospray Ionization,ESI)对化合物进行雾化,喷雾电压:3.5 kV;离子源温度:350 ℃;毛细管温度:350 ℃;鞘气流速:275 kPa;辅助气流速:104 kPa。脂质分子通过正离子模式检测。高分辨质谱的质量轴在使用前通过标准混合物调谐以使仪器达到正常状态。脂质代谢组学半定量数据的获取采用全扫描的扫描模式,扫描范围:*m/z* 200~1 000,分辨率设定为 30 000。脂质成分的定性分析采用高分辨的精确质量数,结合 MSⁿ 碎裂分析。MSⁿ 质谱的触发方式为动态数据依赖分析模式(Data-dependent acquisition

mode),选取上一级最高峰进行碰撞诱导碎裂解离(Collision Induced Dissociation,CID)碎片扫描,碰撞能量设定为30%。

2.5 数据处理 得到的原始数据采用 Xcalibur 2.2 软件进行峰对齐,通过内标归一化进行半定量,得到的数据矩阵导入 SIMCA-P 13.0 软件(Umetrics,Sweden)进行多变量统计分析。通过偏最小二乘-判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis,OPLS-DA)对空白组、RSV 肺炎组和虎杖组进行模式识别和区分。通过 SPSS 13.0 进行单因素方差分析(One ANOVAs Analysis)确定差异性代谢物,得到的差异性代谢物通过高分辨的 m/z 值搜索数据库 METLIN metabolite database (<https://metlin.scripps.edu/index.php>),确定其可能的归属,并通过碎裂途径确定差异代谢物的可能结构。最后查找 KEGG 数据库,分析虎杖干预 RSV 肺炎的脂质代谢通路,阐明其可能干预的机制。

3 结果

3.1 肺组织病理检查 肺组织样品进行苏木精-伊红染色,观察病理切片,结果显示,正常组小鼠肺组织内肺泡、肺内支气管分支及间质组成结构清晰;RSV 肺炎模型组 BALB/c 小鼠表现出肺泡壁轻度气肿,并伴随充血,肺气肿表现为局部肺泡腔增大,肺泡壁变薄,毛细血管数量减少;虎杖组肺组织结构正常,结构清晰,同正常组相似,肺泡壁存在轻度气肿,伴随轻度充血。病理结果显示,RSV 滴鼻诱导肺炎模型成功,而虎杖提取液能够改善 RSV 诱导的肺炎症状。

表 1 小鼠 RSV 肺炎病理评分表 (Mean ± SD)

组别	例数	病理评分
正常组	6	1.33 ± 1.03
RSV 模型组	6	3.17 ± 0.75
虎杖组	6	2.42 ± 1.20

3.2 脂质代谢组学方法的建立 为了能够全面地测定血浆中的脂质成分,本实验优化了血浆样品的提取方法和色谱分离条件以及质谱检测条件,建立的脂质代谢组学分析方法,该方法能够检测到血浆中游离脂肪酸(Free Fatty Acids,FFAs)、磷脂酰胆碱(glycerophosphocholines,PCs)、磷脂酰乙醇胺(glycerophosphoethanolamines,PEs)、三酰甘油(triradylglycerols,TGs)、甘油二酯(diradylglycerols,DGs)、神经酰胺(ceramides,Cers)等脂质分子。图 1 为所建立的脂质代谢组学总离子流图,通过图 1 可以发现游离脂肪酸主要集中在 0 ~ 5 min 内洗脱,溶血性

磷脂酰胆碱(Lyso PCs)和溶血性磷脂酰乙醇胺(Lyso PEs)集中早 5 ~ 13 min,磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺主要集中在 13 ~ 20 min 的时间内洗脱,而三酰甘油和甘油二酯主要集中在 20 ~ 25 min 的时间内洗脱。建立的脂质代谢方法能够较为全面的反映血浆中的主要脂质类成分,能够满足虎杖抗 RSV 肺炎脂质代谢网络调控的相关研究。

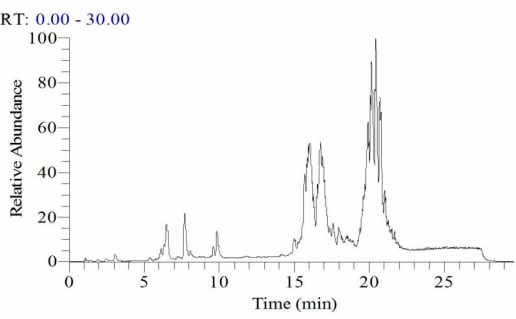


图 1 脂质代谢组学总离子流图

3.3 脂质代谢组学表征 半定量数据所得矩阵建立偏最小二乘判别分析模型(OPLS-DA)用于区分 3 个实验组小鼠的脂质代谢轮廓图,模型的拟合参数 $R^2X = 0.872$, $R^2Y = 0.933$, $Q^2 = 0.748$,说明拟合得到的模型较好。OPLS-DA 模型得分图见图 2。结果显示,空白对照组、RSV 肺炎模型组和虎杖组存在明显的区分,说明 3 组小鼠的血浆脂质代谢轮廓图存在显著差异。通过代谢组学结果能够更加直观、明确、综合的反映了虎杖对于 RSV 肺炎小鼠的干预作用。

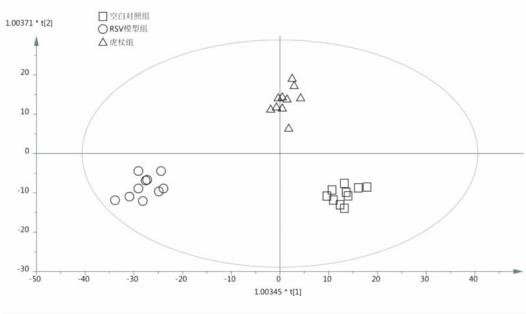


图 2 OPLS-DA 得分图

3.4 差异化合物的分析 通过 OPLS-DA 载荷图和单因素方差分析找寻虎杖提取物可能调控的差异代谢物,共得到 60 个差异性的代谢产物,依据代谢产物的精确质量数查询 METLIN metabolite database (<https://metlin.scripps.edu/index.php>) 数据库,对差异性脂质分子进行结构归属,58 个差异代谢产物中含有磷脂酰胆碱类/磷脂酰乙醇胺 34 个,三酰甘油类 7 个,神经酰胺类 4 个,神经鞘磷脂 4 个,未知化合物 11 个。进一步,根据碎裂途径,对化合物进行结构鉴定,得到溶血性磷脂酰胆碱 7 个、磷脂酰胆

碱类脂质分子 2 个,三酰甘油类化合物 2 个以及磷酸化神经酰胺 4 个。单因素方差结果显示,模型组的各脂质类成分相对于空白组显著降低,而虎杖干预组则能够显著逆转脂质水平的降低(图 3)。

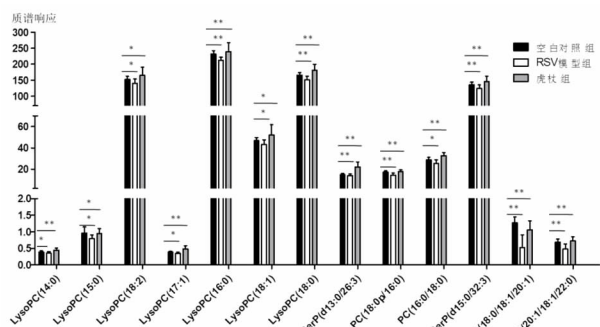


图 3 差异化化合物 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4 讨论

近年来的研究发现,贝拉康坦(猪肺中提取的表面活性物质)能够改善 RSV 患儿的细支气管炎临床症状^[9]。细胞实验结果显示,肺泡表面活性物质的主要成分 1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰甘油(POPG)能够抑制 RSV 诱导产生的细胞炎性反应应答和免疫应答^[10]。此外,通过 RSV 诱导棉鼠肺炎的实验发现,COX-2 抑制剂能够显著抑制 RSV 诱导的棉鼠的肺炎,提示脂质代谢参与了 RSV 的炎性反应^[11]。以上研究结果均充分说明,脂质代谢参与了 RSV 诱导的肺炎。

本论文的研究结果发现有 7 个溶血性磷脂胆碱在模型 RSV 小鼠中表现出显著的降低,包括 LysoPC(18:1)和 LysoPC(16:0)。溶血性磷脂胆碱是肺组织表面活性物质的重要组成部分,此外,在炎性反应中具有重要的调节作用^[12]。RSV 肺炎模型组小鼠体内磷脂酰胆碱和溶血性磷脂酰胆碱的共同降低,提示可能代谢转化成相应的游离脂肪酸,并进一步引发机体产生一系列的酸中毒现象。通过脂质代谢数据发现,虎杖提取物能够逆转磷脂酰胆碱水平的降低,说明虎杖通过调节脂质代谢发挥保护作用。在我们的实验中,发现的另一类重要的脂质分子是磷酸化的神经酰胺,RSV 肺炎模型组小鼠的磷酸化神经酰胺表现为显著降低。目前发现,具有生物活性的信号分子,磷酸化神经酰胺(Ceramide 1-phosphate, C1P)是一种调节细胞增殖和生长发育的重要鞘脂类活性代谢产物,具有促进细胞增殖、抑制细胞迁移、调节炎性反应等作用^[13-14]。C1P 参与了细胞的炎性反应应答,能够刺激胞质型磷脂酶 A2(cytosolic phospholipase A2, cPLA2),进一步促进花生四烯酸和前列腺素的合成和释放^[15]。本实验中,磷酸

化神经酰胺在模型 RSV 小鼠组显著降低,而虎杖提取液能够逆转其水平的降低,说明虎杖可能通过干预磷酸化神经酰胺代谢发挥抗炎的作用。通过我们脂质代谢组学的实验结果,说明虎杖提取物可能对磷脂类代谢调控从而发挥其抗 RSV 的作用,这为临床治疗小儿 RSV 肺炎提供了药理学依据。

参考文献

- [1] Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet, 2010, 375 (9725): 1545-1555.
- [2] 汪爱传, 朱先康, 韩新民, 等. 小儿病毒性肺炎中医证治规律的初步研究 [J]. 中国医药学报, 2003, 18 (12): 729-731.
- [3] 樊慧婷, 丁世兰, 林洪生. 中药虎杖的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (15): 2545-2548.
- [4] Brites P, Waterham HR, Wanders RJA. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2004, 1636 (2): 219-231.
- [5] McGill MR, Li F, Sharpe MR, et al. Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans [J]. Archives of toxicology, 2014, 88 (2): 391-401.
- [6] 杜丽娜, 单进军, 谢彤, 等. 代谢组学在儿科呼吸系统疾病中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (8): 2941-2943.
- [7] 毛庆草, 单进军, 吴皓, 等. 代谢组学在中药及其复方领域中的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30 (2): 197-200.
- [8] 杜丽娜, 单进军, 谢彤, 等. 基于液相质谱联用的黄芩水提液抗病毒效应的脂质组学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (5): 1728-1733.
- [9] Tibby SM, Hatherill M, Wright SM, et al. Exogenous surfactant supplementation in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2000, 162 (4 Pt 1): 1251-1256.
- [10] Numata M, Chu HW, Dakhama A, et al. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107 (1): 320-325.
- [11] Richardson JY, Ottolini MG, Pletneva L, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) infection induces cyclooxygenase 2: a potential target for RSV therapy [J]. Journal of immunology, 2005, 174 (7): 4356-4364.
- [12] Cui L, Lee YH, Kumar Y, et al. Serum metabolome and lipidome changes in adult patients with primary dengue infection [J]. PLoS neglected tropical diseases, 2013, 7 (8): e2373.
- [13] Simanshu DK, Kamlekar RK, Wijesinghe DS, et al. Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids [J]. Nature, 2013, 500 (7463): 463-467.
- [14] Lim J, Kim Y, Heo J, Kim KH, et al. Priming with ceramide-1 phosphate promotes the therapeutic effect of mesenchymal stem/stromal cells on pulmonary artery hypertension [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2016, 473 (1): 35-41.
- [15] Presa N, Gomez-Larrauri A, Rivera IG, et al. Regulation of cell migration and inflammation by ceramide 1-phosphate [J]. Biochimica et biophysica acta, 2016, 1861 (5): 402-409.