



陆涛峰, 博士, 贵州中医药大学副教授, 中国畜牧兽医学会畜禽遗传标记学会理事。2014年博士毕业于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。2014—2019年在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物与比较医学创新团队从事博士后研究工作。2019年6月起就职于贵州中医药大学实验动物研究所, 主要从事实验动物质量控制与实验动物新资源培育相关研究。参加工作以来, 主持国家自然科学基金青年科学基金项目1项, 国家重点研发计划子课题2项, 贵州省科技支撑计划项目1项, 贵州省教育厅自然科学基金项目1项; 以第一完成人身份获得国家发明专利3项; 获批2项地方标准和1项实验动物团体标准; 作为第一作者发表SCI论文10余篇。

广藿香对贵州小型猪血清代谢组的影响及其机制探讨

陆涛峰¹, 张 慧², 周 洁³, 李 倩¹, 吴曙光¹, 吴延军¹

(1. 贵州中医药大学实验动物研究所, 贵阳 550025; 2. 广州中医药大学东莞医院, 东莞 523000; 3. 上海懿尚生物科技有限公司, 上海 201319)

[摘要] 目的 基于液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术研究广藿香对贵州小型猪血清代谢的影响, 探讨其药理学作用机制。方法 将9头贵州小型猪随机分为广藿香给药组 (5头) 和对照组 (4头)。广藿香给药组按 $0.5\text{ g}\cdot\text{头}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量通过拌料经口饲喂广藿香中药配方颗粒, 连续给药8 d; 对照组正常饲喂, 不额外给药。用药结束后采集各组动物的血清样品, 采用LC-MS/MS技术分析各组样品的血清代谢物, 对代谢组数据进行注释并与KEGG、HMDB和Lipidmaps数据库比对, 通过偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、组间聚类、差异代谢物分析和功能富集等生物信息学分析方法, 筛选差异代谢生物标志物及其可能的代谢通路。结果 在广藿香给药组和对照组的血清样本中共鉴定出443个血清代谢物, 筛选出44个差异显著 ($P<0.05$) 的代谢物, 其中显著上调 ($P<0.01$) 的代谢物为肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'- (4-三氟甲基) 苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸 (顺-11, 14)、前列腺素A2和10-羟基癸烯酸, 显著下调 ($P<0.01$) 的代谢物为溶血磷脂酰胆碱22:5、溶血磷脂酸22:6和溶血磷脂酸22:5。差异代谢物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路 (MapID: map00250), 以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路 (MapID: map00430)。结论 广藿香能显著影响贵州小型猪的溶血磷脂酸类物质的代谢, 可能通过影响天冬氨酸-谷氨酸代谢通路、牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路, 起到缓解机体氨基酸代谢紊乱、调节炎症反应发生等功能。

[关键词] 代谢组学; 广藿香; 贵州小型猪; 中药药理; 作用机制

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0253-09



Effects of *Pogostemon cablin* on Serum Metabolomics of Guizhou Miniature Pigs and Its mechanism

LU Taofeng¹, ZHANG Hui², ZHOU Jie³, LI Qian¹, WU Shuguang¹, WU Yanjun¹

(1. Institute for Laboratory Animal Research, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Dongguan Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000, China; 3. Shanghai Yishang Biotechnology Co., LTD., Shanghai 201319, China)

Correspondence to: WU Yanjun (ORCID: 0000-0002-4379-8230), E-mail: 601833449@qq.com

[基金项目] 贵州省科技计划项目“贵州香猪疫病监测体系建立及主要疫病防控技术研究”(黔科合支撑[2020]1Y035)

[第一作者] 陆涛峰(1982—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 实验动物学。E-mail: taofenglu@163.com。ORCID: 0000-0001-5881-905X;

张 慧(1995—), 女, 硕士, 中医师, 研究方向: 中医学。E-mail: mofans318@163.com。ORCID: 0009-0001-9384-9163

[通信作者] 吴延军(1987—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 601833449@qq.com。ORCID: 0000-0002-4379-8230

[ABSTRACT] Objective Based on the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), to study the effects of *Pogostemon cablin* on serum metabolism of Guizhou miniature pigs, and to explore its pharmacological mechanism. **Methods** Nine healthy Guizhou miniature pigs were divided into two groups, namely *Pogostemon cablin* drug group ($n=5$) and control group ($n=4$). The pigs in *Pogostemon cablin* drug group were orally fed with traditional Chinese medicine formula granules, each 0.5 g per day, for consecutive 8 days, while those in control group were given normal feeding without additional treatment. After the feeding experiment, serum samples were collected and analyzed using the LC-MS/MS technology. The metabolomics data was annotated and compared with KEGG, HMDB and Lipidmaps databases. Bioinformatics analysis methods including partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), intergroup clustering, differential metabolite analysis and functional enrichment were used to screen differential metabolic biomarkers and their possible metabolic pathways. **Results** Forty-four differential metabolites ($P<0.05$) were screened out from the 443 metabolites, eight differential metabolites were significantly up-regulated ($P<0.01$), namely cinnamoylglycine, N-benzyl-N-isopropyl-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea, hypotaurine, D-glucose 6-phosphate, cis-2-decenoic acid, 11(Z), 14(Z)-eicosadienoic acid, prostaglandin A2 and 10-hydroxydecanoic acid, and three differential metabolites were significantly down-regulated ($P<0.01$), namely lysophosphatidyl choline 22:5, lysophosphatidic acid 22:6 and lysophosphatidic acid 22:5. The differential metabolites were mainly enriched in the metabolic pathways of alanine, aspartate and glutamate metabolism (MapID: map00250) and taurine and hypotaurine metabolism (MapID: map00430). **Conclusion** *Pogostemon cablin* can significantly affect the metabolism of lysophosphatidic acids in porcine, and relieve the disorder of amino acids metabolism and regulate the occurrence of inflammation by affecting the metabolic pathways of alanine, aspartate and glutamate metabolism and taurine and hypotaurine metabolism.

[Key words] Serum metabolomics; *Pogostemon cablin*; Guizhou miniature pig; Pharmacology of traditional Chinese medicine; Action mechanism

芳香类中药多具有清热解毒、芳香化湿的功效，能够发挥抗病毒、抗菌、消炎解热及调节免疫功能等作用^[1-2]，因此常被应用于防治瘟疫的方剂中^[3]。广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 味辛温，归脾、胃、肺经，具有健脾化湿、消食和胃、散邪除暑等功效^[4-5]。药理学研究显示，广藿香也具有抗炎^[6]、抗菌^[7]、抗病毒^[8]和保护胃肠道正常功能的作用。

在防治新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的临床实践中，中医药发挥了积极作用^[9]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）》推荐的中医治疗方案中，藿香或广藿香被频繁使用用于治疗 COVID-19 多种证型（轻型、普通型、重型）的多种方剂（清肺排毒汤、寒湿疫方、宣肺败毒方和化湿败毒方）中^[1,10-11]。因此，针对广藿香调节机体代谢和免疫，以及抗炎、抗病毒等方面的相关机制研究具有重要意义。

代谢组学分析是利用液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术检测生物系统受到干预后体液中代谢产

物变化的一种简便、快捷的研究方法，例如通过分析在疾病或药物影响下代谢产物及代谢通路的变化，找出代谢产物与生理、病理变化之间的关系^[12-13]。该方法具有无创性、动态性和接近生理条件的特点。利用代谢组学技术开展中药代谢及药效物质基础研究，能极大地提高中药研究的通量和效率，具有明显的科学意义^[14]。

小型猪因其在生理学、解剖学、饮食结构和代谢机制等方面与人类极为相似，是构建人类疾病模型的理想实验动物^[15-17]。因此，本研究通过基于 LC-MS/MS 技术的代谢组学方法，检测防治 COVID-19 的高频中药广藿香在贵州小型猪体内的代谢情况，通过分析广藿香的血清主要代谢产物和代谢通路，初步探讨广藿香发挥作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机挑选普通级成年贵州小型猪 9 头，1.5~2 岁，体重 (28±3) kg，由贵州中医药大学实验动物研究所 [SCXK (黔) 2021-0003] 提供。实验动物在贵州中医

药大学实验动物研究所普通级动物房 [SYXK (黔) 2021-0005] 单笼饲养, 自由饮水, 基础饲料由贵州台农青印迹饲料发展有限公司 [黔饲证 (2022) 01020] 提供。本研究涉及的所有动物实验方案均已通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号: 20210024)。

1.2 主要实验材料

广藿香中药配方颗粒 (批号 160317, 不含其他中药成分) 购自江阴天江药业有限公司, 规格为每袋 0.5 g, 相当于饮片 10 g。LC-MS 级甲醇 (货号 67-56-1)、LC-MS 级甲酸 (货号 64-18-6)、LC-MS 级醋酸铵 (货号 631-61-8) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, LC-MS 级水 (货号 7732-18-5) 购自德国 Merck 公司。

1.3 主要仪器设备

Thermo QE 系列质谱仪 (Q Exactive™ HF-X), Thermo 色谱仪 (Vanquish UHPLC), Thermo 色谱柱 (Hypersil Gold column), Scilogex 低温离心机 (D3024R)。

1.4 动物实验及样品采集

将贵州小型猪随机分为 2 组: 广藿香给药组 5 头, 对照组 4 头。适应性饲养 1 周后, 广藿香给药组通过拌料经口饲喂广藿香中药配方颗粒 $0.5 \text{ g} \cdot \text{头}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于每日每头 10 g 广藿香饮片), 每天上午给药 1 次并确定药品完全被口服, 连续给药 8 d; 对照组正常饲喂, 不额外给药。按照 2017 年版《兽药质量标准》推荐广藿香作用于猪的饲喂剂量标准 $5 \sim 10 \text{ g/d}$, 且为更好地观察给药后差异, 本研究按最大剂量每日每头 10 g 给药。末次给药 24 h 后, 空腹采集每头实验猪的前腔静脉血约 10 mL, 1500 r/min 室温离心 10 min 以分离血清。分别收集广藿香给药组和对照组每只动物的血清样品进行单独的血清代谢组学分析, 血清分析前所有样品暂时保存于 -80°C 冰箱。

1.5 血清代谢组学检测与数据分析

1.5.1 样品处理

在 4°C 环境中解冻血清样品后, 取 $100 \mu\text{L}$ 置于 EP 管中, 加入 $400 \mu\text{L}$ 80% 甲醇溶液; 涡旋振荡, 冰浴静置 5 min, 15000 r/min 、 4°C 离心 20 min; 取 $200 \mu\text{L}$ 上清液, 加 LC-MS 级水稀释至甲醇含量为 53%; 于 15000 r/min 、 4°C 离心 20 min, 收集上清液, 上样并进行 LC-MS/MS 分析。

1.5.2 色谱条件

色谱柱为 Hyperil Gold column (C18); 柱温 40°C , 流速 0.2 mL/min 。正模式流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为甲醇; 负模式流动相 A 为 5 mmol/L 醋酸铵

(pH 9.0), 流动相 B 为甲醇。

1.5.3 质谱条件

扫描范围选择质荷比 (m/z) $70 \sim 1050$ 。电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI) 的设置: 电喷雾电压 (spray voltage) 3.2 kV ; 鞘气流速 (sheath gas flow rate) 35 arb; 辅助气流速 (aux gasflow rate) 10 arb; 毛细管温度 (capillary temp) 320°C ; Polarity 阴性、阳性。MS/MS 二级扫描设置为数据依赖扫描 (data-dependent scans)。

1.5.4 代谢物的鉴定与分析

将 LC-MS/MS 分析获得的下机原始数据导入 Compound Discoverer 3.1 (Thermo Fisher) 软件中, 对保留时间、质荷比等参数进行筛选。然后针对不同样品, 根据保留时间偏差 0.2 min 和质量数偏差 5×10^{-6} 进行峰对齐。随后根据设置的质量偏差 5×10^{-6} 、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度 1×10^5 等信息进行峰提取, 用 blank 样本去除背景离子, 然后将峰值强度归一化为总光谱强度。根据累积离子 (additive ions)、分子离子峰 (molecular ion peaks) 和碎片离子 (fragment ions), 使用归一化数据预测代谢物的分子式。然后将峰图与 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault 和 Mass List 数据库进行比对, 获得鉴定的定量结果。相关数据分析使用 R 语言 (R version 3.4.3)、Python (Python version 2.7.6) 和 CentOS (CentOS release 6.6) 软件完成。

1.5.5 代谢组数据注释及差异代谢物分析

将得到的代谢物分析数据, 使用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)、HMDB (Human Metabolome Database) 数据库 (<https://hmdb.ca/metabolites>) 和 LIPID Maps 数据库 (<http://www.lipidmaps.org/>) 进行注释。使用 metaX 软件进行偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)。使用单变量分析 (t 检验) 来计算统计量的显著性 (P 值)。

差异代谢物的筛选主要参考差异倍数 (fold change, FC)、变量对模型的重要性 (variable importance in the projection, VIP) 和 P 值这 3 个参数, 其中 VIP 值表示代谢物对分组的贡献度, 为 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度。差异代谢物的筛选标准要求 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ 、 $\text{VIP} \geq 1$ 且 $P < 0.05$, 通过计算 $\log_2(\text{FC})$ 和 $-\log_{10}(P\text{-value})$ 生成火山图 (volcano plot), 利用火山图反映差异代谢物。使用不同代谢强度区域

的 z 分数(z -scores)对得到的代谢物数据进行归一化处理,使用R语言的热图(Heatmap)包进行聚类分析并绘制热图。差异代谢物之间的相关性、显著性分析及绘图均使用R语言软件完成。利用KEGG数据库分析这些代谢物的功能和代谢途径,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

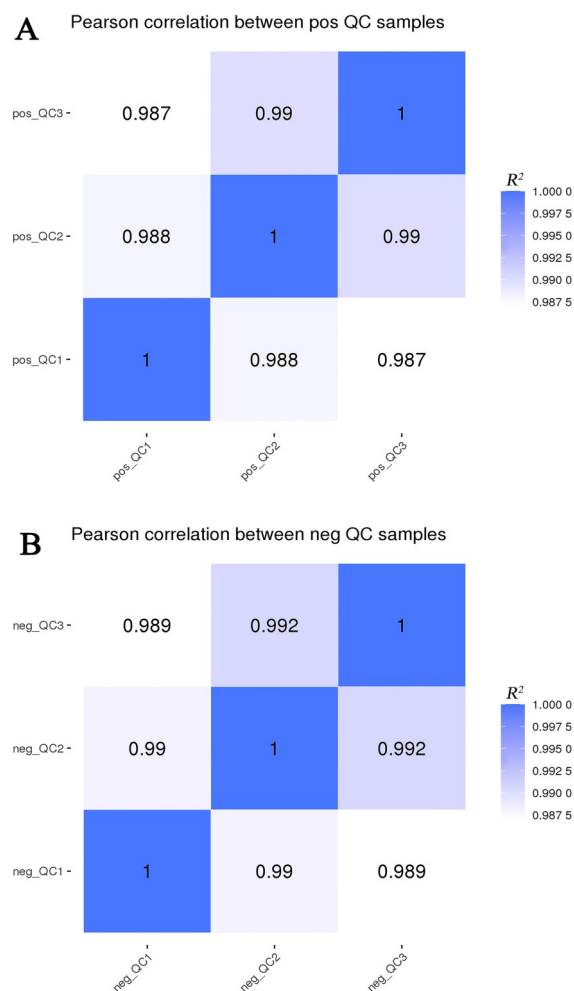
2.1 广藿香给药后实验猪血清经LC-MS/MS初步分析的代谢谱

广藿香给药组按照每日每头10 g广藿香饮片的剂量连续给药8 d,对照组正常饲喂,末次给药24 h后,分别收集广藿香给药组和对照组每头实验猪的血清样品,以进行单独的基于LC-MS/MS技术的血清代谢组学分析。为了提高非靶向代谢组数据的可靠性,本研究首先基于代谢物的相对定量值来计算质量控制(quality control, QC)样本之间的pearson相关系数 R^2 ,以检验整个检测过程的可靠性和稳定性。比较正负离子模式下QC样本的pearson相关系数 R^2 发现,负离子模式下其 R^2 值更接近于1(图1),且色谱峰的保存时间和相应强度稳定性更好。因此,后续结果分析时主要采用负离子模式的结果。

为了直观表现广藿香给药组和对照组血清代谢物的差异,随机挑选广藿香给药组和对照组血清样本经LC-MS/MS分析后的一个总离子流图进行展示,见图2A。从图中可以看出广藿香给药组和对照组血清代谢物在色谱峰的数量和高度上存在明显差异,且集中出现在14~15.5 s范围。基于广藿香给药组和对照组的代谢物种类和数量的数据,进行PLS-DA分析,结果显示组间和组内聚类情况良好,不同组样本点明显分离(图2B),表明广藿香对贵州小型猪的血清代谢组产生了明显影响。

2.2 广藿香给药后实验猪血清代谢物注释

基于负离子模式下广藿香给药组和对照组的代谢物数据,共鉴定出443种代谢产物,所有代谢物的名称、分子式、分子量、保留时间以及相对含量数据详见附表(在本刊官网显示本条文献的附件资料中)。将得到的所有血清样本的代谢物数据与HMDB数据库、KEGG数据库和LIPID Maps数据库进行比对和注释。其中,有156个代谢产物在HMDB数据库上成功比对(图3A),主要为脂类和类脂分子(lipids and lipid-like molecules)、有机酸及其衍生物(organic acids and



注:QC指质量控制样本;pos指阳离子模式;neg指阴离子模式。
Note:QC, Quality control sample; pos, Positive ion mode; neg, Negative ion mode.

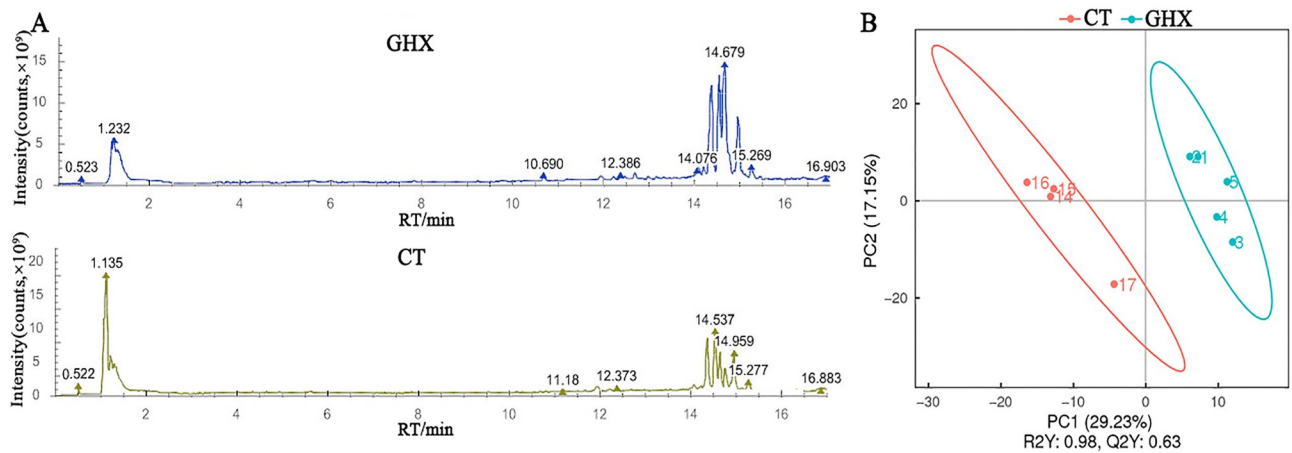
图1 正(A)负(B)离子模式下QC样本的两两相关性分析
Figure 1 Pairings correlation of QC samples in positive (A) and negative (B) ion mode

derivatives)。有98个代谢产物在KEGG数据库上成功比对(图3B),主要为氨基酸代谢(amino acid metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)和消化系统(digestive system)有关的代谢产物。有128个代谢产物在LIPID Maps数据库上成功比对(图3C),主要为甘油磷酸胆碱(glycerophosphocholines[GP01])、脂肪酸和偶联物(fatty acids and conjugates[FA01])和甘油磷酸酯(glycerophosphates[GP10])。

2.3 广藿香给药后实验猪血清差异代谢物分析

2.3.1 差异代谢物筛选

用火山图对广藿香给药组和对照组的差异代谢物进行展示(图4A)。根据上调代谢物的 $\log_2(FC) \geq 1$ 、下调代谢物的 $\log_2(FC) \leq -1$ 、VIP ≥ 1 且 t 检验 $P<0.05$ 的标



注：A，负离子模式下的LC-MS/MS总离子流图；B，代谢物的偏最小二乘判别分析（PLS-DA）得分图。GHX为广藿香给药组，CT为不加药、正常饲喂的对照组；RT，治疗时间。

Note: A, LC-MS/MS negative mode scanning total ion flow diagram; B, Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score map for metabolite data. GHX, *Pogostemon cablin* drug group given 0.5 g/head of traditional Chinese medicine formula granules per day by mixing materials through oral feeding for consecutive 8 days; CT, The control group given normal feeding without additional treatment; RT, Treatment time.

图2 广藿香给药后猪血清代谢物的LC-MS/MS总离子流图(A)及PLS-DA得分图(B)

Figure 2 The results of LC-MS/MS negative mode scanning total ion flow diagram (A) and PLS-DA score map (B) of serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

准，筛选出差异显著的代谢物。结果显示，在443个代谢物中共筛选出44个显著差异代谢物（ $P<0.05$ ），其中30个为上调的代谢物，14个为下调的代谢物。这些差异代谢产物中，显著上调（ $P<0.01$ ）的代谢物有8个，分别为肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸（顺-11,14）、前列腺素A2和10-羟基癸烯酸；显著下调（ $P<0.01$ ）的代谢物有3个，分别为溶血磷脂酰胆碱22:5

（lysophosphatidyl choline 22:5, LPC 22:5）、溶血磷脂酸22:6（lysophosphatidic acid 22:6, LPA 22:6）和溶血磷脂酸22:5（lysophosphatidic acid 22:5, LPA 22:5）。差异代谢物信息如表1所示。

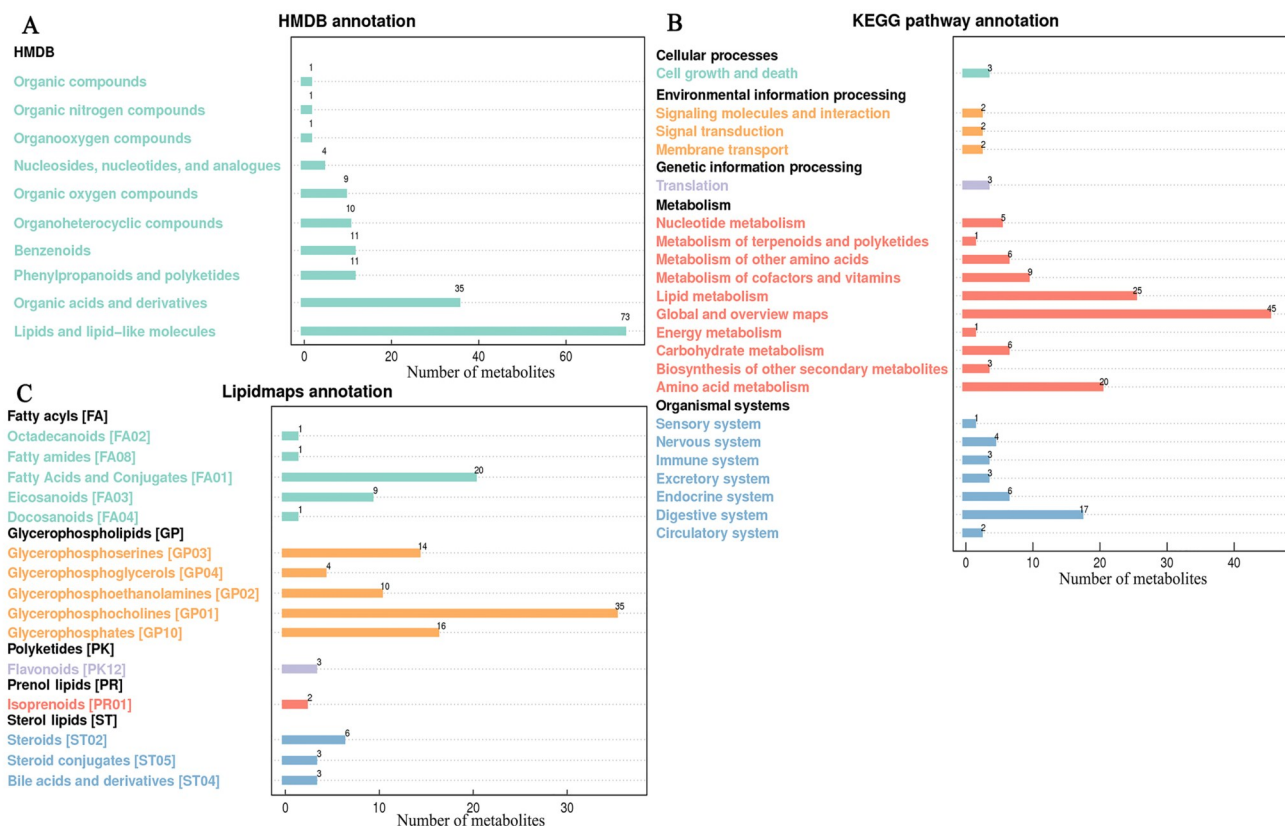
2.3.2 组间聚类分析

对从广藿香给药组和对照组实验猪血清样本中获得的差异代谢物进行聚类分析，比较两组间代谢物差异情况，结果显示广藿香给药可导致贵州小型猪的代谢水平发生改变（图4B）。与对照组相比，广藿香给

表1 广藿香给药后影响猪血清主要差异代谢物的基本信息

Table 1 The basic information of the main differential metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

代谢物 Metabolites	代谢物中文名称 Metabolites in Chinese	保留时间/min Retention time/ min	$\log_2$ (FC)	P值 P value
Cinnamoylglycine	肉桂酰甘氨酸	8.378	3.670	0.001
N-benzyl-N-isopropyl-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl] urea	N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素	4.541	2.217	0.005
Hypotaaurine	亚牛磺酸	14.485	1.703	0.008
D-Glucose 6-phosphate	D-葡萄糖-6-磷酸	1.158	1.595	0.003
cis-2-Decenoic acid	顺-2-癸烯酸	12.057	1.536	0.002
11(Z),14(Z)-Eicosadienoic acid	二十碳二烯酸(顺-11,14)	14.820	1.349	0.007
Prostaglandin A2	前列腺素A2	12.727	1.289	0.008
10-Hydroxydecanoic acid	10-羟基癸烯酸	11.707	1.261	0.004
Lysophosphatidyl choline 22:5	溶血磷脂酰胆碱22:5	14.673	-2.190	0.002
Lysophosphatidyl acid 22:6	溶血磷脂酸22:6	14.010	-2.201	<0.001
Lysophosphatidyl acid 22:5	溶血磷脂酸22:5	14.139	-2.361	0.003



注：A～C 分别为 HMDB（Human Metabolome Database）数据库、KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）数据库和 LIPID Maps 数据库的对比注释结果。

Note: A to C are the comparative annotation results of HMDB (Human Metabolome Database) database, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, and LIPID Maps database, respectively.

图3 广藿香给药后猪血清中差异代谢物的注释结果

Figure 3 Annotation results of serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

药组中 LPC 22:5、LPA 22:6 和 LPA 22:5 等的含量明显下调，而肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸（顺-11,14）、前列腺素 A2 和 10-羟基癸烯酸等含量明显上调。相关性分析结果显示，显著性下调的差异代谢产物（LPC 22:5、LPA 22:6、LPA 22:5）之间呈正相关，而与上述显著性上调的差异代谢产物呈负相关，同样显著性上调的差异代谢产物之间呈正相关（图 4C）。

2.3.3 代谢通路富集分析

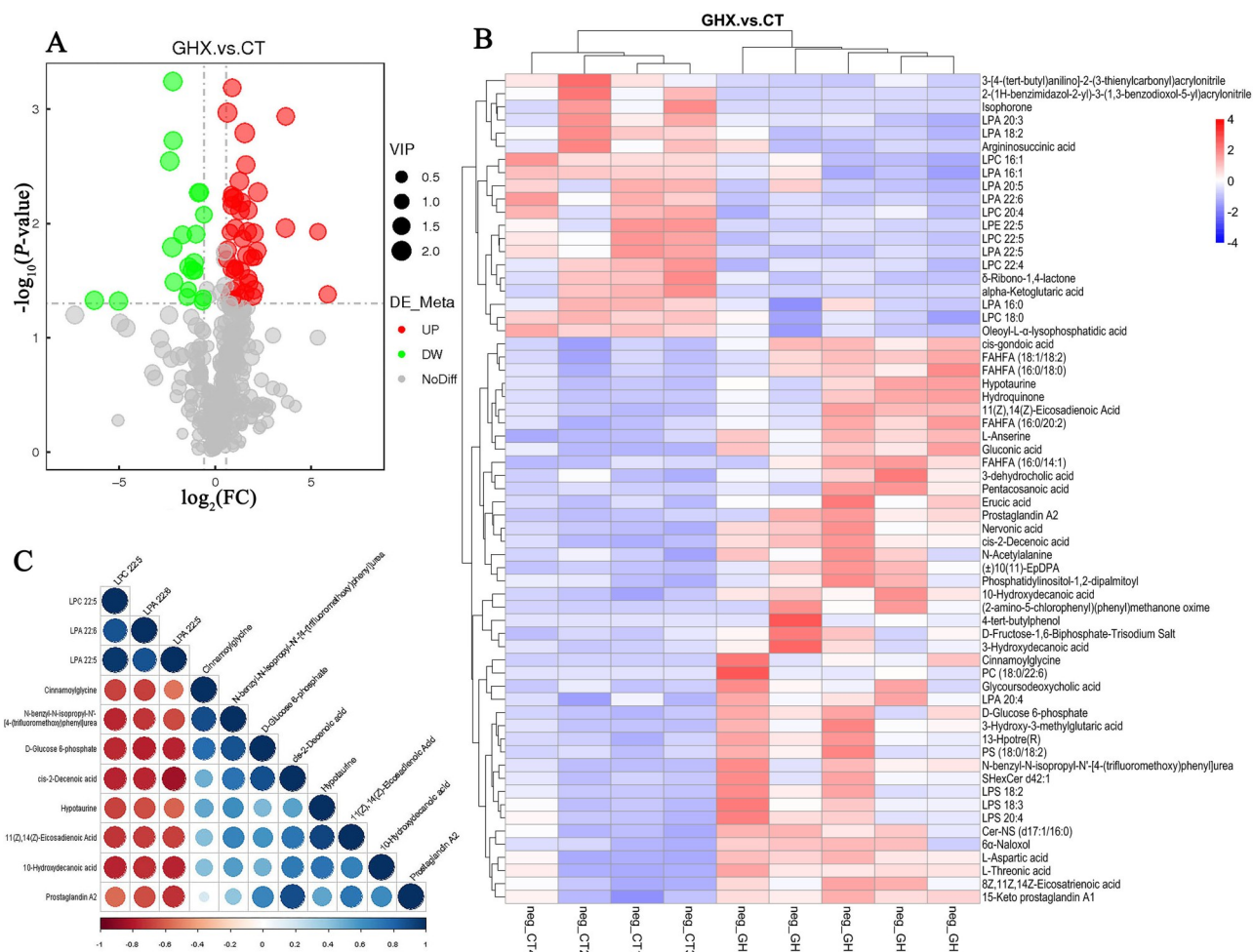
利用 KEGG 数据库将 44 个差异代谢物的相关数据进行注释、功能聚类 and 显著性分析，结果显示，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路（MapID: map00250, $P=0.031$ ）、牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路（MapID: map00430, $P=0.031$ ）是显著富集的代谢通路（ $P < 0.05$ ），其中，L-天门冬氨酸和 α -酮戊二酸是 map00250 通路的主要差异代谢物， α -酮戊二酸和亚牛

磺酸是 map00430 通路的主要差异代谢物。

3 讨论

血清代谢组学分析技术是通过检测介入因素前后血清中代谢物的变化，分析介入因素影响代谢网络的变化，进而为疾病机制的阐释和新的生物标志物的发现提供依据。对于成分复杂的中医药物，采用单组分独立验证的方式探究其发挥作用的物质基础及机制比较繁琐、费时、费力^[12]。血清代谢组学是从整体的血清生物化学表现型来把握生物的功能状态，这与中医学的“整体论”相一致，也适用于中医药发挥作用的物质基础及机制研究^[18]。通过对中医药作用后血清代谢组学分析，找到显著变化的代谢物，研究差异代谢物与生理学表型之间的关系，再有目的地验证中医药发挥作用的物质基础及机制，不失为一种有的放矢的思路^[14]。

病毒作为外源生物因子，入侵机体后可以引起



注: GHX 为广藿香给药组, CT 为不加药、正常饲养的对照组; FC, 差异倍数。

Note: GHX, *Pogostemon cablin* drug group given 0.5 g/head of traditional Chinese medicine formula granules per day by mixing materials through oral feeding for consecutive 8 days; CT, The control group given normal feeding without additional treatment; FC, Fold change.

图4 广藿香组(GHX)和对照组(CT)猪血清差异代谢物的火山图(A)、聚类热图(B)和相关性分析图(C)

Figure 4 Volcanic map (A), clustering heat map (B) and correlation analysis diagram (C) of differential serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

宿主细胞的脂质代谢发生变化,这主要是由于宿主代谢资源被用于病毒感染的不同阶段^[19]。不同病毒感染引起机体血浆或血清中脂类代谢产物的变化也有差异,例如在感染寨卡病毒的患者中,磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamines, PEs)类脂质代谢产物的水平明显上升^[20];感染COVID-19的患者体内会发生胞质磷脂酶A2 α (cPLA2 α)活化,引发肺部炎症,血清中溶血磷脂酸类物质(LPAs、LPCs和LPIs)的含量显著增多,而磷脂酸类物质(PAs、PCs和PIs)含量显著减少^[21]。溶血磷脂酸类物质是一类内源性的生物活性分子,参与调节多种生物学功能。本研究,广藿香给药的贵州小型猪血清中溶血磷脂酸类物质(LPC 22:5、LPA 22:6和LPA 22:5)表达显著下调

($P < 0.001$),说明广藿香能影响溶血磷脂酸类物质代谢,这可能与之发挥药效作用有很大相关性。另外,鉴于广藿香具有显著调节溶血磷脂酸类物质代谢的功能,后续可能基于广藿香开发调节溶血磷脂酸类物质的专门药物。

氨基酸代谢是机体重要的代谢途径,该代谢紊乱会影响机体炎症反应和免疫功能的调节^[22]。轻度和中度COVID-19患者中许多氨基酸(包括丝氨酸、色氨酸、缬氨酸、脯氨酸、甘氨酸和异亮氨酸)显著减少。重症COVID-19患者气道黏液的蛋白质组学分析结果显示,有375个COVID-19相关蛋白在氨基酸(包括 β -丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸)代谢通路发生了显著富集,这表明COVID-19能引起机体的氨基

酸代谢功能紊乱^[23]。另外,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路可以受到黄芪甲苷IV的影响,在减轻急性肾损伤和调节炎性反应及自身免疫功能中发挥作用^[24]。亚牛磺酸是牛磺酸的前体,是半胱氨酸氧化为半胱亚磺酸后,在半胱亚磺酸脱羧酶作用下去羧基的产物^[25]。牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径通常与炎性反应和药物发挥抗炎作用相关^[26]。本研究中,广藿香给药的贵州小型猪血清中差异代谢产物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路(MapID: map00250)以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路(MapID: map00430),表明广藿香可能通过影响机体氨基酸代谢来起到缓解机体氨基酸代谢紊乱、调节炎性反应发生等功能。

综上所述,本研究发现广藿香能显著影响溶血脂酸类物质的代谢,可能通过调节天冬氨酸-谷氨酸代谢通路(MapID: map00250)和牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路(MapID: map00430)起到逆转机体氨基酸代谢紊乱,调节炎性反应,进而缓解肺部炎症的作用。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号:20210024)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (IACUC No. 20210024). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

陆涛峰负责方案设计、样品采集、数据分析和初稿撰写等;
张慧负责动物实验、样品采集和初稿撰写等;
周洁参与数据分析和数据可视化等;
李倩参与动物实验和修改稿修订等;
吴曙光负责提供资源和动物实验指导等;
吴延军负责方案设计、样品采集、提供资助和监督指导等。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 罗晶,殷宁,黄小英,等.芳香中药防治新型冠状病毒肺炎作用机制探究[J].江西中医药大学学报,2020,32(3):66-73.
LUO J, YIN N, HUANG X Y, et al. Study on the mechanism of aromatic traditional Chinese medicine compound on
- prevention and treatment of new coronavirus pneumonia[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2020, 32(3): 66-73.
- [2] 梁嘉丽.环氧广藿香烯抗炎及抗胃溃疡的药效及机制研究[D].广州:广州中医药大学,2018.
LIANG J L. Evaluation of patchoulene epoxide on the activity of anti-inflammation and gastroprotection[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018.
- [3] 陈春宇,董汉玉,纪瑞锋,等.基于中医药理论的芳香类中药防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用探讨[J].中草药,2020,51(11):3051-3061. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.025.
CHEN C Y, DONG H Y, JI R F, et al. Discussion on role of aromatic Chinese herbs in prevention and treatment of COVID-19 based on theory of traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(11): 3051-3061. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.025.
- [4] 徐雯,吴艳清,丁浩然,等.广藿香的药理作用及机制研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(10):103-106. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2017.10.028.
XU W, WU Y Q, DING H R, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanism of Herba Pogostemonis[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2017, 51(10): 103-106. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2017.10.028.
- [5] 齐乐辉,王知斌,孟永海,等.中药广藿香有效成分及药理作用研究进展[J].化学工程师,2018,32(2):49-50,56. DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20180249.
QI L H, WANG Z B, MENG Y H, et al. Research progress of the active ingredient and pharmacological action of Chinese medicine patchouli[J]. Chem Eng, 2018, 32(2): 49-50, 56. DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20180249.
- [6] 黎玉翠.广藿香酮及广藿香醇的抗炎、抗真菌活性及药物代谢研究[D].广州:广州中医药大学,2013.
LI Y C. Metabolism, anti-inflammatory and anti-fungal activities of pogostone and patchouli alcohol[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013.
- [7] 王磊,李跟旺.广藿香抗菌消炎调节免疫作用的最新研究[J].西部中医药,2018,31(2):138-140.
WANG L, LI G W. The latest research of antibacterial action, anti-inflammatory action and regulating immunity of patchouli[J]. West J Tradit Chin Med, 2018, 31(2): 138-140.
- [8] 魏晓露.广藿香油抗病毒的物质基础研究[D].成都:成都中医药大学,2013.
WEI X L. Research on material basis of antiviral of patchouli oil[D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine, 2013.
- [9] 仝小林,李修洋,赵林华,等.从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略[J].中医杂志,2020,61(6):465-470,553.
TONG X L, LI X Y, ZHAO L H, et al. Discussion on traditional Chinese medicine prevention and treatment strategies of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from the perspective of "cold-dampness pestilence"[J]. J Trad Chinese Med, 2020.61(6):465-470,553.
- [10] 邵仲柏,朱月霞,刘书豪,等.临床使用治疗新型冠状病毒肺炎中药复方中高频率中药抗病毒研究概述[J].中草药,2020,51(5):1153-1158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.009.
SHAO Z B, ZHU Y X, LIU S H, et al. A review on clinical

- application of high frequency traditional Chinese medicine in treatment of coronavirus pneumonia 2019[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(5): 1153-1158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.009.
- [11] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-1122. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.004.
- DENG Y J, LIU B W, HE Z X, et al. Study on active compounds from Huoxiang Zhengqi Oral Liquid for prevention of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(5): 1113-1122. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.004.
- [12] 魏聪聪, 朱明丹, 冯利民, 等. 代谢组学技术在中医证候学和药效物质基础研究中的应用[J]. 江苏中医药, 2012, 44(1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2012.01.001.
- WEI C C, ZHU M D, FENG L M, et al. Application of metabonomics technology in the study of TCM syndromes and pharmacological material basis[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2012, 44(1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2012.01.001.
- [13] 马素娜, 关亚奇, 张森, 等. 代谢组学技术在中医证候学研究中的应用优势[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1714-1716.
- MA S N, GUAN Y Q, ZHANG M, et al. The advantage of metabolomics in the study of TCM syndrome[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(7): 1714-1716.
- [14] 杨艳, 韦炎龙, 方峰. 代谢组学阐明中医药治疗代谢性疾病的机制研究[J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(9): 1601-1605. DOI: 10.16448/j.cjtc.2020.0901.
- YANG Y, WEI Y L, FANG F. Research progress of mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of metabolic diseases from metabolomics[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(9): 1601-1605. DOI: 10.16448/j.cjtc.2020.0901.
- [15] 李小海, 刘新峰, 伍瑶斌, 等. 多排螺旋CT重建技术测量贵州成年小型猪支气管[J]. 解剖学杂志, 2019, 42(1): 40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2019.01.010.
- LI X H, LIU X F, WU Y B, et al. Bronchial data of adult Guizhou miniature pig measured by multiple spiral computed tomography and its reconstruction technique in vivo[J]. Chin J Anat, 2019, 42(1): 40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2019.01.010.
- [16] 王郭琦, 吴曙光, 陈明飞, 等. 贵州小型猪肾虚动物模型的建立[J]. 贵州科学, 2019, 37(5): 48-51. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2019.05.009.
- WANG G Q, WU S G, CHEN M F, et al. Construction of kidney Yang deficiency animal model with Guizhou miniature pigs[J]. Guizhou Sci, 2019, 37(5): 48-51. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2019.05.009.
- [17] 张慧, 吴延军, 姚瑾, 等. 五苓散对高脂血症模型贵州小型猪的治疗作用[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 138-142. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.188.
- ZHANG H, WU Y J, YAO J, et al. Therapeutic effect of Wuling Powder on Guizhou mini-pigs of hyperlipidemia model[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(2): 138-142. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.188.
- [18] 于兰, 金鑫, 南红梅. 代谢组学技术在中医"整体观念、辨证论治"理论研究中的应用[J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(20): 191-192. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2015.20.140.
- YU L, JIN X, NAN H M. The application of the theory of the "holistic concept, the syndrome differentiation and treatment" of the traditional Chinese medicine[J]. China Continuing Med Educ, 2015, 7(20): 191-192. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2015.20.140.
- [19] Xiaoyong C, Shuaiwei W, Peiling G, et al. Comprehensive analysis of lipid metabolism in influenza virus infection[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 175.
- [20] MARTÍN-ACEBES M A, VÁZQUEZ-CALVO Á, SAIZ J C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses[J]. Prog Lipid Res, 2016, 64: S0163-S7827(16)30015-7. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.09.005.
- [21] SONG J W, LAM S M, FAN X, et al. Omics-driven systems interrogation of metabolic dysregulation in COVID-19 pathogenesis[J]. Cell Metab, 2020, 32(2): S1550-S4131(20) 30317-X. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.06.016.
- [22] HE S S, WANG Y L, XIE J H, et al. ¹H NMR-based metabolomic study of the effects of flavonoids on citrinin production by *Monascus*[J]. Food Res Int, 2020, 137: S0963-S9969(20)30557-3. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109532.
- [23] ZHANG Z L, WANG T, LIV F, et al. The proteomic characteristics of airway mucus from critical ill COVID-19 patients[J]. Life Sci, 2021, 269: 119046. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119046.
- [24] JIANG M, KUANG S F, LAI S S, et al. Na⁺-NQR confers aminoglycoside resistance via the regulation of l-alanine metabolism[J]. mBio, 2020, 11(6): e02086-e02020. DOI: 10.1128/mBio.02086-20.
- [25] 胡恺. 神经胶质细胞与胶质瘤细胞亚牛磺酸代谢特征的差异研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2018.
- HU K. Study on the difference of metabolic characteristics of glutamate in glial cells and glioma cells[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2018.
- [26] ZHOU J, YAO N, WANG S X, et al. Fructus Gardeniae-induced gastrointestinal injury was associated with the inflammatory response mediated by the disturbance of vitamin B6, phenylalanine, arachidonic acid, taurine and hypotaurine metabolism[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 235: 47-55. DOI: 10.1016/j.jep.2019.01.041.

(收稿日期: 2022-12-05 修回日期: 2023-02-09)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 崔占鼎)

引用本文

- 陆涛峰, 张慧, 周洁, 等. 广藿香对贵州小型猪血清代谢组的影响及其机制探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 253-261. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.186.
- LU T F, ZHANG H, ZHOU J, et al. Effects of *Pogostemon cablin* on serum metabolomics of Guizhou miniature pigs and its mechanism[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 253-261. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.186.