

引用:程思益,黄贵锐,张诗瑜,崔红生.基于血清代谢组学分析哮喘宁治疗心理应激哮喘的作用机制[J].中医导报,2025,31(2):1-6,29.

实 验

基于血清代谢组学分析哮喘宁治疗心理应激哮喘的作用机制*

程思益^{1,2},黄贵锐^{1,2},张诗瑜^{1,2},崔红生¹

(1.北京中医药大学第三附属医院,北京 100029;

2.北京中医药大学,北京 100029)

[摘要] 目的:基于非靶向代谢组学技术探讨心理应激哮喘(PSA)小鼠的血清代谢物变化及哮喘宁治疗PSA的作用机制。方法:运用随机数字表法将32只SPF级雄性BALB/c小鼠分为正常组、哮喘组、心理应激哮喘组和中药组。除正常组外的小鼠第1、8天腹腔注射卵蛋白(OVA)和氢氧化铝混合液,第15天开始采用1%OVA溶液雾化激发建立哮喘模型,其中心理应激哮喘组、中药组从第1天起给予束缚刺激,连续束缚28 d,建立PSA模型。中药组小鼠从第15天起予哮喘宁连续给药14 d。第28天进行无创肺功能检测及旷场实验,实验结束后收集小鼠肺组织及血清,运用HE染色法观察肺组织病变,采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)对各组小鼠血清样本小分子代谢产物进行分析,运用主成分分析法(PCA)及偏最小二乘判别法(PLS-DA)等统计学手段筛选特征代谢物质,并对筛选后的代谢物所涉及的生物代谢通路进行富集分析研究。结果:心理应激哮喘组与哮喘组相比,肺部炎症细胞浸润明显,肺通气功能特殊气道阻力(sRAW)升高,50%呼出量时的呼气流速(EF50)下降,旷场实验总运动距离和运动速度下降,内源性物质分离明显,筛选出差异代谢物89个,主要富集在精氨酸生物合成、 β -丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、GABA能突触代谢通路。与心理应激哮喘组比较,哮喘宁对该组小鼠气道炎症、肺功能sRAW、EF50和旷场实验运动距离、运动速度具有回调作用,筛选出差异代谢物50个,主要富集在色氨酸代谢、味觉传导、突触小泡循环、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成代谢通路。结论:PSA小鼠内源性代谢物及代谢通路发生改变。哮喘宁可改善部分差异代谢物及代谢通路紊乱,进而改善哮喘的症状及抑郁状态。

[关键词] 心理应激哮喘;哮喘宁;代谢组学;超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS);小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)02-0001-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.02.001

Effects of Xiaochuanning (哮喘宁) on the Mechanism of Action in Treating Psychological Stress-Related Asthma Based on Serum Metabolomics Analysis

CHENG Siyi^{1,2}, HUANG Guirui^{1,2}, ZHANG Shiyu^{1,2}, CUI Hongsheng¹

(1.Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China;

2.Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To explore the changes in serum metabolites in mice with psychological stress-related asthma (PSA) and the mechanism of action of Xiaochuanning in treating PSA based on untargeted metabolomics technology. Methods: Totally 32 SPF-level male BALB/c mice were distributed into four distinct clusters at random, including control group, asthma group, PSA group, and Chinese medicine group. Except for the control group, all other groups of mice received an intraperitoneal administration of a concoction containing ovalbumin and aluminum hydroxide on the 1st and 8th days. Subsequently, from the 15th day, they were exposed to an aerosol of 1% ovalbumin solution to induce the asthma model. The PSA and Chinese medicine groups received restraint stress from the 1st day for 28 consecutive days to establish the PSA model. The Chinese medicine group was administered Xiaochuanning continuously from 15th day for 14 days. Non-invasive lung function tests and open field tests were performed on 28th day. Samples of lung tissue and blood

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274497)

通信作者:崔红生,男,教授,主任医师,研究方向为中医药防治肺系疾病

serum were gathered. Lung tissue was used for disease investigation with HE, and blood serum was analyzed to identify small-molecule metabolites using ultra-performance liquid chromatography linked with mass spectrometry (UPLC-MS). Principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to screen differential metabolites and analyze metabolic pathways. Results: Compared with the asthma group, the PSA group exhibited significant pulmonary inflammatory cell infiltration, increased specific airway resistance (sRAW), decreased expiratory flow at 50% tidal volume (EF50), reduced total movement distance, and movement speed in the open field test, and significant separation of endogenous metabolites. A total of 89 differential metabolites were identified, mainly enriched in arginine biosynthesis, β -alanine metabolism, unsaturated fatty acid biosynthesis, arginine and proline metabolism, and GABAergic synapse metabolic pathways. Compared with the PSA group, the Chinese medicine group showed improvements in airway inflammation, lung function (sRAW, EF50), total movement distance, and movement speed in the open field test. A total of 50 differential metabolites were identified, mainly enriched in tryptophan metabolism, taste transduction, synaptic vesicle cycle, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis metabolic pathways. Conclusion: Endogenous metabolites and metabolic pathways in PSA mice are altered. Xiaochuanning can ameliorate some of the differential metabolites and disrupted metabolic pathways, thereby improving asthma symptoms and depressive states.

[Keywords] psychological stress-induced asthma; Xiaochuanning; metabolomics; ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS); mice

哮喘是一种常见的慢性呼吸道疾病,病因繁多,发病机制复杂,易反复发作,给患者的日常生活带来了极大的困扰和负担。其发病和发展过程可受到生理因素和心理因素等多种因素影响。随着哮喘患病率的持续上升,加强对哮喘的生物-心理-社会认识,在开发新的治疗靶点、增强疾病控制和提高生活质量中尤为重要^[1]。鉴于此,心理应激哮喘(psychological stress-related asthma, PSA)作为一个重要表型被提出,哮喘与心理问题之间互为因果,导致疾病加重,迁延难愈^[2]。中医理论中“肝失疏泄”为心理应激的关键病机,哮喘的发生为肺气上逆所致。肝肺二脏功能失常是心理应激哮喘的病理,调肝理肺为本病的根本治法。本课题组前期研究发现首都国医名师武维屏基于“调肝理肺”思想创制的哮喘宁颗粒在临床研究和基础实验中均取得了显著疗效^[3],然而哮喘宁治疗本病的作用机制有待进一步研究。因此,本实验拟通过慢性束缚刺激联合卵清蛋白(OVA)致敏建立小鼠PSA模型,并采用液相色谱-质谱法(UPLC-MS)及非靶向代谢组学分析,探讨PSA小鼠内源性代谢物的差异。同时,研究哮喘宁对PSA小鼠内源性代谢物的调节作用,以期进一步揭示哮喘宁的药效作用机制,为中医药调肝理肺法治疗PSA提供科学依据。

1 材 料

1.1 动物 32只4~5周龄SPF级雄性BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SYXK(京)2021-0006,体质量18~20 g。小鼠均被饲养于温度(23±2)℃、湿度(55±10)%,12 h光照/12 h黑暗循环的屏障环境中,予普通全价鼠粮饲养,自由摄食饮水,适应性喂养7 d后造模。本研究已获得北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会的批准,伦理审查批号为BUCM-2023020802-1188。

1.2 药物与试剂 哮喘宁颗粒为北京康仁堂药业有限公司生产制备的浓缩配方颗粒剂,10 g/袋。组方包括柴胡10 g、白芍10 g、枳壳10 g、炙甘草6 g、黄芩10 g、清半夏9 g、炙麻黄6 g、葶苈子10 g、前胡10 g、地龙10 g、丹参15 g,批号依次为21010771、

21014001、21004161、21003471、21012201、21011221、20040921、21011071、20041691、21007351、21003421,由北京中医药大学第三附属医院中药房统一采购。卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝佐剂(美国Sigma公司,批号分别为SLCH2414、VE301887)。甲醇、乙腈、甲酸(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为A452-4、A998-4、A117-50),苏木素、伊红染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200235、20200926)。

1.3 主要仪器 BX53型光学显微镜(日本Olympus公司),液相色谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,IQLAAGABH-FAPUMZZZ),质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,IQLAEGAAPFALGMAZR),冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,H1850-R),混匀仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,BE-2600),真空浓缩仪(Eppendorf,5305),滤膜(天津津腾实验设备有限公司,0.22 μ m PTFE)。

2 方 法

2.1 动物分组、造模与给药 所有小鼠7 d适应性喂养后,运用随机数字表法按体质量分为正常组、哮喘组、心理应激哮喘组、中药组,每组8只。参照文献[4-6]建立心理应激哮喘小鼠模型,除正常组外,其余3组小鼠于实验第1天、第8天腹腔注射浓度为0.25 mg/mL的OVA混悬液,200 μ L/20 g。正常组小鼠给予等量生理盐水腹腔注射。第15天开始每天雾化吸入1% OVA溶液激发20 min(流量2 mL/min),连续14 d。从实验第1天起将心理应激哮喘组、中药组小鼠每天束缚制动,第1天为2 h,以后每天增加10 min,时间最长至6 h,束缚期间禁食水,每日束缚制动开始时间均不相同,连续28 d。结合课题组前期研究,参考《药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》^[7],中药组予以哮喘宁颗粒[3.58 g/(kg·d)]灌胃,其余各组均予等量灭菌饮用水灌胃。

2.2 行为学检测 参考文献[8]于实验第28天进行小鼠旷场行为学实验,采用50 cm×50 cm×50 cm的正方体敞箱作为实验区,小鼠被放置于敞箱中心后测定小鼠5 min内的总运动距离

和运动速度,评价心理应激状态。每只小鼠实验结束后用75%乙醇擦拭箱底进行清洁消毒。

2.3 无创肺功能检测 采用BUXCO小动物肺功能-NAM无创气道机制检测系统进行肺功能检测^[9],记录各组小鼠特定气道阻力(sRaw)、50%呼出量时的呼气流速(EF50),评价气道反应性。

2.4 标本收集 末次给药后各组小鼠禁食不禁水12 h,心脏取血,分离血清样本-80℃冰箱冻存待用。解剖小鼠剪取肺组织,左肺固定于4%多聚甲醛溶液中,右肺收集于冻存管置-80℃冰箱冻存备用。

2.5 肺组织病理切片制备与观察 4%多聚甲醛固定样本进行石蜡包埋,而后连续切片机切片,厚度为4 μm,用苏木素-伊红(HE)法染色,封片后在光学显微镜下观察小鼠的肺部组织病理学变化。

2.6 血清样本处理 小鼠血清样本在4℃条件下解冻,解冻完成后,涡旋混合1 min以确保充分混合。随后从中准确取出100 μL放入2 mL的离心管中。之后加入400 μL的甲醇,再次涡旋1 min。将该混合液4℃ 12 000 r/min离心10 min,离心半径为10 cm,然后将上层清液小心转移到新的2 mL离心管中并进行浓缩直至干燥。将150 μL的80%甲醇水溶液(含2-氯-L-苯丙氨酸4 ppm)添加到样品中以重新溶解,然后通过0.22 μm滤膜将上清液过滤。过滤后的液体转移到分析瓶中,以供UPLC-MS分析使用。另外,通过混合等体积的各种样本的上层液来配置质量控制(QC)样品,以供设备进行分析。

2.7 色谱条件 使用Thermo Vanquish超高效液相系统(美国Thermo Fisher Scientific公司)和ACQUITY UPLC[®] HSS T3色谱柱(2.1 mm×100.0 mm,1.8 μm)(Waters, Milford, MA, USA)进行分析。实验条件:流速固定为0.3 mL/min,色谱柱温度为40℃,每次注入的样本量为2 μL。在正离子模式下,移动相是由0.1%的甲酸-乙腈溶液(B₂)与0.1%的甲酸-水溶液(A₂)配制而成,其梯度洗脱过程如下:初始至1 min保持8%B₂;1.0~8.0 min B₂逐渐增至98%;8.0~10.0 min维持98%B₂;10.0~10.1 min B₂急剧降至8%;10.1~12.0 min保持8%B₂。采用负离子模式时,移动相由乙腈(B₃)和5 mmol/L甲酸铵溶液(A₃)组成,梯度洗脱步骤与正离子模式相同:起始至1.0 min为8%B₃;1.0~8.0 min B₃递增至98%;8.0~10.0 min保持98%B₃;10.0~10.1 min B₃突降至8%;并在最后的10.1~12.0 min保持其为8%。

2.8 质谱条件 使用Thermo Orbitrap Exploris 120质谱检测器(美国Thermo Fisher Scientific公司)和电喷雾离子源,在正负离子模式下进行数据采集。在采用正电离模式时,设置喷射电压为3.50 kV;进行负电离模式分析时,则将电压调至-2.50 kV。同时,本设备的鞘气和辅助气流量分别维持在40 arb与10 arb。毛细管温度设为325°,使用60 000的高解析度,对质量到电荷比范围在100~1 000之间的样本进行全面的一级扫描。二级质谱的裂解分析由高能碰撞解离(HCD)实施,设定碰撞能量为30%,并以15 000的解析度对前4个主要离子峰进行分裂分析,应用动态排除技术以过滤无需的MS/MS数据。

2.9 多元统计分析 借助Graphpad Prism 10进行数据加工、统计分析及绘图,正态分布的计量数据以“均数±标准差”(x±s)表示。在对多个检验群组间的差值进行比时,采用单变量

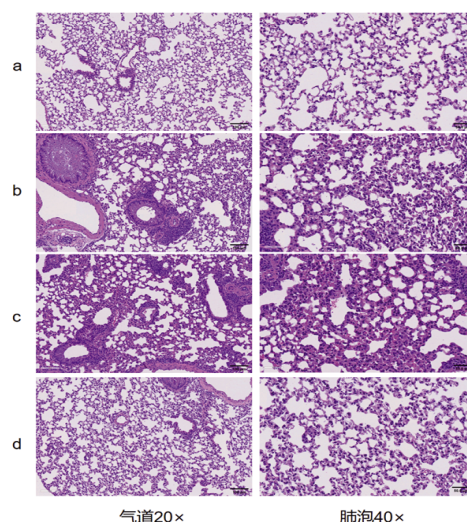
方差分析方法(ANOVA)。针对两个特定检验群组的对照分析,采取LSD检验和独立样本t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

运用Proteowizard软件包^[10](版本v3.0.8789)中MSConvert程序将原始质谱下机文件转换为mzXML文件格式。随后运用R的XCMS软件包^[9]进行峰检测、峰过滤、峰对齐处理,得到化合物的定量分析表,参数设置为bw=2,ppm=15,peakwidth=c(5,30),mzwid=0.015,mzdiff=0.01,method='centWave'。采用公共数据库HMDB^[11],massbank^[12],LipidMaps^[13],mzcloud^[14],KEGG^[15]及自建物质库进行物质的鉴定,参数设置为ppm<30 ppm。通过采用QC样本的LOESS^[16]信号调节技术进行修正,以排除系统误差。在数据质控中,将筛去QC样本中相对标准偏差(RSD)大于30%的物质。利用R软件包Ropls^[17]对样本数据分别进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA),运用具有高度监督性能的OPLS-DA法分析筛选组间差异代谢物。通过统计检验计算P值、使用OPLS-DA降维方法获取变量投影重要度(VIP)和计算组间差异倍数(fold change,FC),评估各类代谢物质在样本分类识别过程中的作用强度和解释能力,辅助标志代谢物的筛选。当 $P<0.05$ 且VIP>1时,认为该代谢物差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般状况观察 各组小鼠的宏观表现有明显差异。正常组小鼠毛发洁白且光泽,活泼好动,大便正常;哮喘组小鼠毛发缺少光泽,鼻部发红;心理应激哮喘组小鼠毛发散乱,懒动消瘦,反应迟缓,鼻部发红,大便稀溏,气味臭秽;哮喘宁组小鼠较心理应激哮喘组小鼠的宏观表征有所改善。

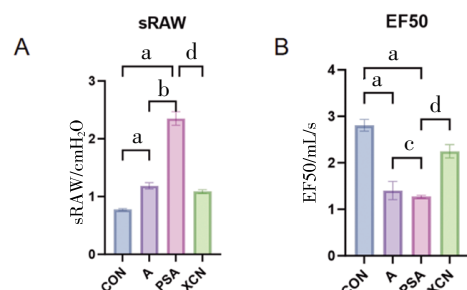
3.2 肺组织病理切片 选取同一层级支气管进行观察,HE结果显示,正常组(a)肺组织支气管黏膜上皮完整,各层结构清晰可见,气管腔规则,无异常增生及细胞浸润;哮喘组(b)肺组织可见明显炎症细胞浸润,可至血管周围和结缔组织,气管腔狭窄,黏膜增厚,黏液腺增生,部分管腔可见分泌物;心理应激哮喘组(c)肺组织较哮喘组炎症细胞浸润明显,有以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,气道重塑明显;哮喘宁组(d)支气管黏膜损伤较轻,较心理应激哮喘组明显减轻。(见图1)



注:a为正常组,b为哮喘组,c为心理应激哮喘组,d为哮喘宁组。

图1 各组肺组织病理图

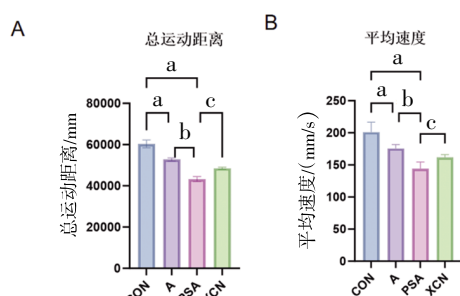
3.3 肺功能检测 与正常组(CON)比较,哮喘组(A)和心理应激哮喘组(PSA)小鼠sRAW显著增加,EF50显著下降($P<0.01$)。PSA组小鼠sRAW显著高于A组($P<0.01$),PSA组小鼠EF50与A组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。经过哮喘宁治疗后,sRAW降低,EF50上升,与PSA组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。(见图2)



注:CON为正常组,A为哮喘组,PSA为心理应激哮喘组,XCN为哮喘宁组。与CON组比较,^a $P<0.01$;与A组比较,^b $P<0.01$;^c $P>0.05$;与PSA组比较,^d $P<0.01$ 。

图2 各组小鼠肺功能比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.4 旷场实验 与CON组比较,A组和PSA组的总运动距离、平均速度显著下降($P<0.01$)。经过哮喘宁治疗后,总运动距离、平均速度显著上升,与PSA组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图3)



注:CON为正常组,A为哮喘组,PSA为心理应激哮喘组,XCN为哮喘宁组。与CON组比较,^a $P<0.01$;与A组比较,^b $P<0.01$;与PSA组比较,^c $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠旷场实验结果比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.5 代谢组学结果分析

3.5.1 质量控制 在本次实验中,通过LC-MS分析采取QC样本以执行质量控制,PCA分析图中可见QC样本集中排列,数据可靠。(见图4)

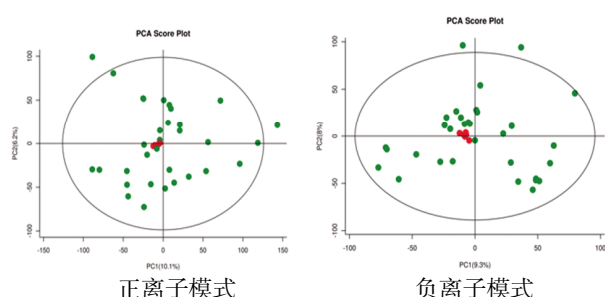


图4 正负离子QC样本PCA得分图

3.5.2 PLS-DA分析 采用有监督模式识别方法偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminate analysis,

PLS-DA)对样本进行分析,当 R^2Y 的值趋近于1且 Q^2 的数值超过0.5时,表明构建的模型具有较高的拟合精度。由各组小鼠血清的正负离子模式PLS-DA得分散点图可知,正常组、哮喘组、心理应激哮喘组、哮喘宁组显著分离。(见图5)

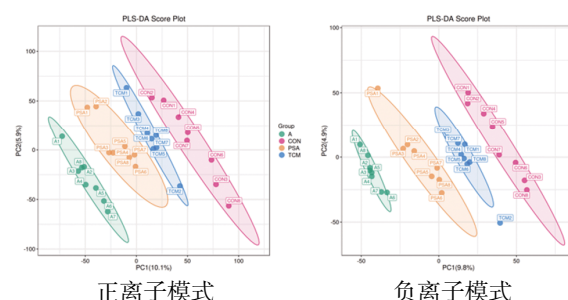


图5 正负离子模式 PLS-DA 得分散点图

3.5.3 心理应激哮喘组与哮喘组差异代谢物分析 以统计检验中预设的 P 值和VIP阈值进行筛选差异代谢物,心理应激哮喘组较哮喘组,确定差异代谢物89个,其中表达上调58个,表达下调31个。火山图(图6-A)中显示 P 值最小的5个代谢产物,显著上调的有花生四烯酸、壬二酸、吡啶丙酸亚胺和3-甲基硫代丙酸,显著下调的有D-甘露糖。富集前20条差异代谢通路如气泡图所示(图6-B),主要富集在精氨酸生物合成、 β -丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、GABA能突触代谢通路。通路涉及的显著变化代谢物见表1。

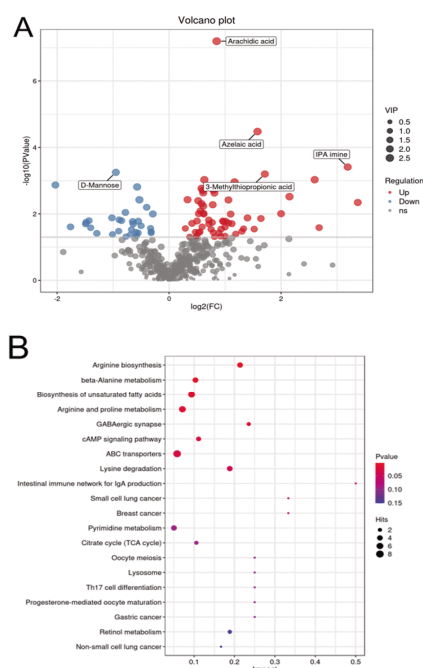


图6 心理应激哮喘组/哮喘组差异代谢物分析

3.5.4 经哮喘宁治疗的差异代谢物分析 哮喘宁组较心理应激哮喘组,确定差异代谢物50个,其中表达上调10个,表达下调40个。火山图(图7-A)中显示 P 值最小的5个代谢产物,显著下调的有谷氨酸、烟酸、硬脂酸、木糖醇基葡萄糖苷、2-脱氢泛酸。富集前20条差异代谢通路如气泡图所示(图7-B),主要富集在色氨酸代谢、味觉传导、突触小泡循环、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成和癌症中的中央碳代谢。通路涉及的显著变化代谢物见表2。

表 1 心理应激哮喘组/哮喘组差异代谢通路-代谢物分析

通路名称	总计	显著变化数	P	影响值	代谢物名称
精氨酸生物合成	23	4	0.002 908 795	0.213 8	α-酮戊二酸,瓜氨酸,N-乙酰谷氨酸,N-α-乙酰瓜氨酸
β-丙氨酸代谢	32	4	0.009 829 126	0.103 4	亚精胺,丙二酸,尿基丙酸,β-丙氨酰-L-精氨酸
不饱和脂肪酸生物合成	74	6	0.013 552 260	0.093 8	亚油酸,花生四烯酸,α-亚麻酸,芥酸,二十碳五烯酸,11,14,17-二十碳三烯酸
精氨酸和脯氨酸代谢	78	6	0.017 255 799	0.071 1	亚精胺,胍乙酸,肌酐,N-甲基海因,4-乙酰氨基丁酸,D-章鱼碱
GABA能突触代谢	9	2	0.022 697 302	0.235 3	α-酮戊二酸,琥珀酸

表 2 哮喘宁组/心理应激哮喘组差异代谢通路-代谢物分析

通路名称	总计	显著变化数	P	影响值	代谢物名称
色氨酸代谢	83	6	0.001 213 817	0.172 2	氧代戊二酸,咪唑,3-羟基蒽醌酸,5-羟色胺,L-甲酰犬尿氨酸,3-咪唑乙腈
味觉传导	32	3	0.011 142 270	0.078 9	L-苹果酸,5-羟色胺,乙酰胆碱
突触小泡循环	12	2	0.012 854 579	0.166 7	5-羟色胺,乙酰胆碱
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	34	3	0.013 168 062	0.131 6	L-酪氨酸,苯丙酮酸,咪唑
癌症中的中央碳代谢	37	3	0.016 577 807	0.075 5	α-酮戊二酸,L-酪氨酸,L-苹果酸

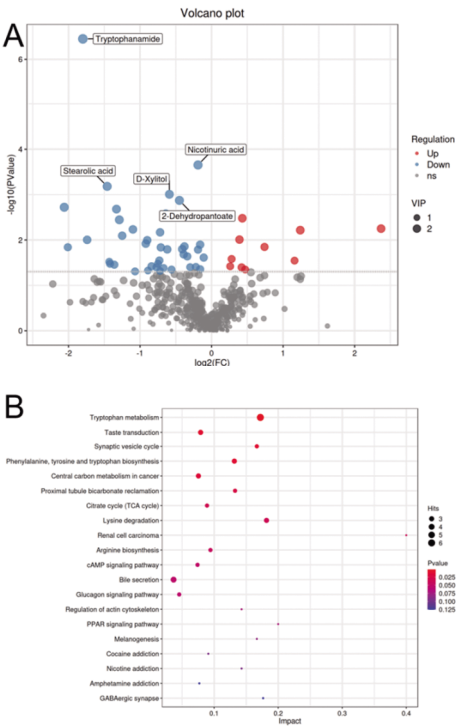


图 7 哮喘宁组/心理应激哮喘组差异代谢物分析

4 讨 论

支气管哮喘是典型的心身疾病,心理应激状态如抑郁、焦虑等是哮喘发作和加重的触发因素。焦虑、抑郁可促使过度通气、呼吸肌疲劳,加剧哮喘症状。频繁的哮喘发作又可对患者心理状态造成负面影响,从而形成恶性循环。一项对韩国人口的大型队列数据集的纵向设计研究发现,哮喘和抑郁症存在密切双向关联^[18]。心理应激与哮喘互为因果,关系密切,可共同导致疾病加剧。本研究采用的慢性束缚诱导心理应激状态可以较好地模拟情志异常的综合病理过程^[2]。哮喘组和心理应激哮喘组小鼠肺组织病理均有不同程度的炎症浸润及气道重塑,肺功能表现为气道阻力升高,旷场实验总运动距离和平均速度显著下降,表现为抑郁样行为。哮喘宁可改善气道炎症及抑郁样行为。为更好地挖掘心理应激哮喘

的生物学标志物及探究哮喘宁发挥治疗作用的机制,笔者运用非靶向代谢组学对内源性差异代谢物进行了筛选。

本研究发现,心理应激哮喘组较哮喘组对比,花生四烯酸是差异最明显的内源性代谢物。富集差异代谢通路中的差异代谢物亚油酸、α-亚麻酸、二十碳五烯酸和11,14,17-二十碳三烯酸均属于脂肪酸家族,与花生四烯酸在生物合成和代谢途径中存在直接或间接的联系。花生四烯酸及其代谢产物白三烯、前列腺素等在哮喘及心理应激中发挥重要作用。有研究^[19-20]表明,哮喘患者气道中的花生四烯酸含量增加,可以通过分泌磷脂酶A2和脂氧合酶等酶促反应生成大量促炎介质。心理应激通过增加大脑中花生四烯酸代谢产物(如前列腺素E₂)的合成,参与多巴胺能调控进而促进焦虑或抑郁样行为。差异代谢通路主要富集在精氨酸生物合成、β-丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、GABA能突触代谢通路,涉及氨基酸和脂质代谢途径。精氨酸代谢失衡在哮喘发病机制中起重要作用。研究发现,精氨酸含量升高可诱导一氧化氮合酶和精氨酸酶代谢,加剧哮喘严重程度^[21]。心理应激哮喘组较哮喘组精氨酸相关代谢通路激活,气道反应性及肺部炎症程度显著升高。此外,心理应激哮喘组GABA能突出代谢通路激活。GABA作为中枢神经系统中的主要抑制性神经递质,对于调节神经元的兴奋性、情绪和行为具有关键作用^[22]。这一发现为我们提供了进一步了解心理应激与哮喘之间交互作用的生物学基础。

哮喘宁组较心理应激哮喘组的差异代谢物分析中,色氨酸是组间差异最明显的内源性代谢物,色氨酸与哮喘和心理应激障碍的发病密切相关。有研究^[23-24]表明过敏患者较健康人血浆色氨酸水平升高,色氨酸代谢谱的改变可以增加机体的易感性或直接诱发炎症。内源性色氨酸的合成和代谢过程在抑郁症的发病机制中发挥直接或间接的作用。色氨酸代谢产物5-羟色胺水平的下降与抑郁症状的出现密切相关,代谢途径犬尿氨酸途径直接代谢产物咪唑能诱发较强的抑郁症状^[25]。心理应激哮喘组色氨酸含量增加,表现为气道炎症加重和更强的抑郁样行为。哮喘宁治疗后色氨酸含量明显下降,气道炎症及行为学有明显改善,表明哮喘宁可能通过调节内

源性色氨酸代谢通路发挥作用。进一步对差异代谢物进行代谢通路富集发现,哮喘宁可调节色氨酸代谢和苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、味觉传导、突触小泡循环和癌症中的中央碳代谢等代谢途径。临床研究^[20]表明,苯丙氨酸和色氨酸的代谢影响免疫细胞功能,与抑郁、生活质量下降或认知损害的发展有关。味觉传导、突触小泡循环代谢通路中代谢物5-羟色胺与色氨酸代谢关系密切。上述差异代谢通路中的差异代谢物乙酰胆碱是副交感神经节后神经元释放的神经源性神经递质,不仅诱导平滑肌收缩和黏液分泌,还促进气道炎症,促进气道重塑^[21]。同时乙酰胆碱在应激反应中起关键作用,可通过调节神经和行为反应,影响个体对应激的适应和行为表现^[28]。本研究中哮喘宁组可调节上述代谢通路及代谢物,与其他研究结果相印证,这为后续研究提供了新的方向。

综上所述,心理应激哮喘小鼠较哮喘组小鼠内源性代谢物及相关代谢通路发生显著改变,心理应激可加剧哮喘症状。哮喘宁可回调部分差异代谢物水平,调节部分氨基酸和脂质代谢途径,特别是影响色氨酸代谢发挥中枢及外周免疫中的抗炎作用,改善哮喘症状及抑郁样行为。虽然本研究采用的非靶向代谢组分析技术能较全面地检测多种代谢产物,但无法提供精确量化信息,存在一定局限性。课题组后续将在此基础上通过氨基酸、脂质等靶向代谢组学进行研究并验证,为哮喘宁治疗心理应激性哮喘提供更多科学依据。

参考文献

- [1] KROLL J L, RITZ T. Asthma, the central nervous system, and neurocognition: Current findings, potential mechanisms, and treatment implications[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 146: 105063.
- [2] 李长安,崔红生,弓雪峰,等.调肝理肺法通过HPA轴对心理应激哮喘大鼠Th1/Th2调节作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(9): 837-845.
- [3] 弓雪峰,任培中,崔红生,等.基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒防治心理应激哮喘的作用网络与潜在机制[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(4): 576-589.
- [4] 侯丹,黄帅阳,吕明圣,等.哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠的治疗作用及抗氧化作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(2): 55-61.
- [5] ZHOU D G, DIAO B Z, ZHOU W, et al. Oroxylin A inhibits allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced asthma murine model[J]. *Inflammation*, 2016, 39(2): 867-872.
- [6] 彭帅,蔡旻,程悦,等.哮喘宁调节IRE-1 α -XBP-1s信号轴干预哮喘大鼠气道炎症的机制研究[J]. *中医导报*, 2024, 30(2): 1-7, 19.
- [7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 刘燕,彭梦薇,刘高源,等.4T1乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索[J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(3): 36-44.
- [9] 晋一帆,李胜群,孙竹筠,等.基于实时体温监测技术探讨酵母菌、脂多糖、2,4-二硝基酚对小鼠致热作用及呼吸功能的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 454-462.
- [10] RASMUSSEN J A, VILLUMSEN K R, ERNST M, et al. A multi-omics approach unravels metagenomic and metabolic alterations of a probiotic and synbiotic additive in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 21.
- [11] NAVARRO-REIG M, JAUMOT J, GARCÍA-REIRIZ A, et al. Evaluation of changes induced in rice metabolome by Cd and Cu exposure using LC-MS with XCMS and MCR-ALS data analysis strategies[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(29): 8835-8847.
- [12] WISHART D S, TZUR D, KNOX C, et al. HMDB: The human metabolome database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: D521-D526.
- [13] HORAI H, ARITA M, KANAYA S, et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences[J]. *J Mass Spectrom*, 2010, 45(7): 703-714.
- [14] SUD M, FAHY E, COTTER D, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D527-D532.
- [15] ABDELRAZIG S, SAFO L, RANCE G A, et al. Metabolic characterisation of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 using LC-MS-based metabolite profiling[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(54): 32548-32560.
- [16] KANEHISA M, GOTO S. KEGG Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [17] GAGNEBIN Y, TONOLID, LESCUYER P, et al. Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 955: 27-35.
- [18] CHOI H G, KIM J H, PARK J Y, et al. Association between asthma and depression: A national cohort study[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2019, 7(4): 1239-1245.e1.
- [19] GRANT G E, GRAVEL S, GUAY J, et al. 5-oxo-ETE is a major oxidative stress-induced arachidonate metabolite in B lymphocytes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(10): 1297-1304.
- [20] TALLIMA H. Clarification of arachidonic acid metabolic pathway intricacies[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(24): 15559-15563.
- [21] XU W L, COMHAIR S A A, JANOSHA A J, et al. Arginine metabolic endotypes related to asthma severity[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183066. (下转第29页)

- Harb Perspect Biol, 2018, 10(1):a029314.
- [7] 毛祥娣, 杨泽希, 丛馨. 三细胞紧密连接蛋白tricellulin表达与功能调控的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(12): 2276–2282.
- [8] 杨靖源, 蒙俊, 杨堃. 肠紧密连接蛋白与肠道屏障功能[J]. 医学综述, 2022, 28(2): 235–239.
- [9] 崔世超, 柳越冬. 溃疡性结肠炎的中医治疗思路[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(7): 1381–1384.
- [10] 黄晓燕, 郑超伟, 罗莉川, 等. 四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型occludin和claudin-1表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(5): 829–833.
- [11] WANG J, ZHANG C L, GUO C M, et al. Chitosan ameliorates DSS-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving microflora[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5751.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [13] 惠毅, 闫曙光, 李京涛, 等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型建立方法探讨[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10): 62–65.
- [14] 刘震宇. 芍药汤对UC大鼠免疫屏障的调节机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [15] MURTHY S N, COOPER H S, SHIM H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin[J]. Dig Dis Sci, 1993, 38(9): 1722–1734.
- [16] SCHMIDT N, GONZALEZ E, VISEKRUNA A, et al. Targeting the proteasome: Partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis[J]. Gut, 2010, 59(7): 896–906.
- [17] ROBERTS-THOMSON I C, BRYANT R V, COSTELLO S P. Uncovering the cause of ulcerative colitis[J]. JGH Open, 2019, 3(4): 274–276.
- [18] CHEN Y H, SHIN J Y, WEI H M, et al. Prevention of dextran sulfate sodium-induced mouse colitis by the fungal protein Ling Zhi-8 via promoting the barrier function of intestinal epithelial cells[J]. Food Funct, 2021, 12(4): 1639–1650.
- [19] 肖依, 彪雅宁, 王月, 等. 燮理汤对溃疡性结肠炎小鼠炎症因子及肠黏膜屏障损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(4): 1–6.

(收稿日期: 2023-12-07 编辑: 罗英姣)

(上接第6页)

- [22] OCHOA-DE LA PAZ L D, GULIAS-CANIZO R, D'ABRIL RUÍZ-LEYJA E, et al. The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology[J]. Rev Mex De Neurociencia, 2021, 22(2): 67.
- [23] KOSITZ C, SCHROECKSNADEL K, GRANDER G, et al. High serum tryptophan concentration in pollinosis patients is associated with unresponsiveness to pollen extract therapy[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2008, 147(1): 35–40.
- [24] 吴昊, 闫彤彤, 朱宇琪, 等. 代谢组学在多环芳烃诱发儿童哮喘中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2023, 43(7): 1004–1010.
- [25] 张若琳, 漆正堂, 刘微娜. 微生物-肠-脑轴视角下色氨酸代谢介导的运动抗抑郁机制研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2023, 42(3): 227–235.
- [26] STRASSER B, SPERNER-UNTERWEGER B, FUCHS D, et al. Mechanisms of inflammation-associated depression: Immune influences on tryptophan and phenylalanine metabolisms[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2017, 31: 95–115.
- [27] WU W H, LI J N, CHEN S, et al. The airway neuro-immune axis as a therapeutic target in allergic airway diseases[J]. Respir Res, 2024, 25(1): 83.
- [28] CHEN Y, ZHANG Y, WANG J Y, et al. Anti-neuroinflammation effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation against depression-like behaviors via hypothalamic $\alpha 7$ nAChR/JAK2/STAT3/NF- κ B pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(9): 2634–2644.

(收稿日期: 2024-05-28 编辑: 罗英姣)