

- 代化), 2019, 21(7): 1458-1466.
- [8] 谢艳妮, 姚平, 杨朝晖, 等. 达英-35 联合利拉鲁肽对多囊卵巢综合征患者内分泌代谢指标的影响[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(22): 5271-5274.
- [9] 黄湘妃, 池蓉蓉. 揸针配合功能锻炼治疗肩关节周围炎的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(4): 610-612.
- [10] Ba X Y, Wang J L, Zhou S Y, et al. Cinobufacini protects against paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain and suppresses TRPV1 up-regulation and spinal astrocyte activation in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 76-84.
- [11] 王之遥, 李璋珊, 李艾伦, 等. 二甲双胍治疗坐骨神经结扎诱发大鼠神经病理性疼痛的效应[J]. 中国临床医学, 2019, 26(2): 200-204.
- [12] Dixon W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20: 441-462.
- [13] 徐利娟, 冯程程, 阿曼古丽·苏力唐, 等. 温通活血乳膏对2型糖尿病周围神经病变模型大鼠背根神经节 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 112-115; 261.
- [14] 王双, 张生, 陈玉芹. 肌电图在糖尿病周围神经病变诊断中的临床应用及价值体会[J]. 国际感染病学(电子版), 2020, 9(2): 54-55.
- [15] Mccarthy B G, Hsieh S T, Stocks A, et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy[J]. *Neurology*, 1995, 45(10): 1848-1855.
- [16] 张玲, 朱静. 紫杉醇所致周围神经病变的机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(3): 204-209.
- [17] 刘强, 梁健, 陈燕. 早期神经肌电图、震动感觉阈值测定及双下肢血管彩超检查对2型糖尿病周围神经病变的诊断价值[J]. 海南医学, 2021, 32(15): 1950-1954.
- [18] 邓宇童, 蔡玲玲, 任雪雯, 等. 青石止痒软膏对特异性皮炎小鼠信号素3A/神经生长因子及相关信号分子的影响[J]. 环球中医药, 2021, 14(11): 1958-1965.
- [19] 简娇敏, 陈冲, 朱涛. FABP7 与 TLR4 在糖尿病周围神经病变模型小鼠脊髓中的表达[J]. 南昌大学学报(医学版), 2021, 61(4): 18-23.
- [20] 唐春颖, 冷锦红. 论痛性糖尿病周围神经病变相关电压门控离子通道[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 157-161.
- [21] 曹志龙, 李德龙, 陈冰婷, 等. 牛磺酸对胰岛素抵抗 HepG2 细胞氧化应激的保护作用及机制研究[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(13): 2157-2160; 2165.
- [22] Kim H K, Hwang S H, Abdi S. Tempol ameliorates and prevents mechanical hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced neuropathic pain[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 1(7): 532.

基于非靶向代谢组学研究毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的 PC12 细胞损伤的保护机制

张雪阳¹, 吕全军^{1*}, 熊玉清², 黄佳敏³, 李鹏飞¹

(1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450000; 3. 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450000)

摘要: 目的 基于非靶向代谢组学研究毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及机制。方法 采用氯化血红素构建 PC12 细胞损伤模型。CCK-8 法检测细胞增殖及凋亡情况, LC-MS 法检测细胞非靶代谢组学。通过单变量统计分析、多维统计分析进行差异代谢物的筛选, 通过 KEGG 通路富集分析找出差异代谢物可能参与的代谢通路。结果 与对照组比较, 毛蕊异黄酮组 PC12 细胞存活率升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), *Bcl-2* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), *Bax* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。通过非靶代谢组学研究发现了 10 个特异性代谢物, 通路富集分析发现嘌呤代谢可能是毛蕊异黄酮保护氯化血红素所致细胞凋亡的主要通路。结论 毛蕊异黄酮可能通过调控嘌呤代谢抑制氯化血红素所致 PC12 细胞的凋亡从而发挥保护作用。

关键词: 毛蕊异黄酮; 脑出血; PC12 细胞; 嘌呤代谢

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2073-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.051

收稿日期: 2024-02-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82104642); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20200275)

作者简介: 张雪阳(1998—), 女, 硕士生, 从事临床营养学研究。Tel: (0371) 66295072, E-mail: zhangxueyang0111@163.com

* 通信作者: 吕全军(1962—), 男, 博士, 教授, 从事临床营养学研究。Tel: (0371) 66295072, E-mail: lqjnutr@zzu.edu.cn

脑卒中是一种常见疾病,主要包括缺血性卒中和出血性卒中,其中出血性卒中主要包括蛛网膜下腔出血和脑内出血^[1],是人类的第二大死因和第三大残疾原因^[2]。卒中已成为最重要的健康问题之一,给社会带来巨大的经济负担,因此深入研究脑卒中的发生发展规律、及时给予干预治疗,对挽救患者社会功能具有重要意义^[3-4]。

毛蕊异黄酮是从黄芪根部提取的异黄酮类化合物,是一种植物雌激素,还存在于黄花、野生葛根、锦鸡、苦参、甘草等植物中,但由于其在黄芪中的含量最高,现普遍将毛蕊异黄酮视为黄芪根提取物^[5]。毛蕊异黄酮具有广泛的药理活性,包括抗癌、抗炎、抗氧化、保护神经、保护血管等^[6],但是其在出血性卒中方面的研究报道较少,且相关机制尚不明确。

非靶向代谢组学技术可以通过对各类代谢物进行大规模、无偏向的检测,最大程度反映生物体内的代谢水平扰动情况,从而广泛应用于各个领域^[7-8]。因此,本研究拟在细胞水平采用代谢组学方法探究脑出血疾病中涉及的异常代谢途径,探索毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的PC12细胞损伤模型保护作用及机制。

1 材料

1.1 试剂与药物 毛蕊异黄酮对照品(货号 B20846,纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司);氯化血红素(货号 16009-13-5,美国 Glpbio 公司);RPMI 1640 培养基、乙酸钠(货号 R8758、631-61-8,美国 Sigma 公司);胎牛血清(货号 A6907FBS,美国 Invigentech 公司);特级马血清(货号 S9050,北京索莱宝科技有限公司);CCK-8 检测试剂盒(货号 CK04,日本 Dojindo 公司);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号 KGA1102-20,江苏凯基生物技术股份有限公司);FastPure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit、Hiscript III Reverse Transcriptase(货号 RC112-01、R302-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司);Premix Pro Taq HS qPCR Kit(货号 AG11718,湖南艾科瑞生物工程有限公司);乙腈、甲醇、氨水(货号 A998、A452、1336-21-6,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 仪器 恒温培养箱(上海施都凯仪器设备有限公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置显微镜[舜宇光学科技(集团)有限公司];流式细胞仪(美国贝克曼公司);细胞破碎仪(美国 Sonics 公司);漩涡混匀仪[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];酶标仪(美国 BioTek 公司);AB Triple TOF 6600 质谱仪(美国 SCIEX 公司);色谱柱(美国 Waters 公司)。

1.3 细胞 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12(货号 CL-0481,武汉普诺赛生命科技有限公司),使用含 10% 马血清、5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中,每 2~3 d 传代 1 次,取对数期细胞进行实验。

2 方法

2.1 氯化血红素、毛蕊异黄酮剂量筛选 取对数期 PC12

细胞以每孔 8×10^3 个的密度接种于 96 孔板中,置于培养箱中培养至贴壁后,给予不同浓度的氯化血红素(80、100、120、140、160 $\mu\text{mol/L}$)或毛蕊异黄酮(0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)干预 24 h。每孔加入 10 μL CCK8,在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中孵育 3 h,于 450 nm 波长处检测吸光度,计算细胞存活率及 IC₅₀。每组设置 5 个复孔,重复 3 次。

2.2 细胞分组与处理 取对数期 PC12 细胞,置于培养箱中培养至贴壁后,分为对照组、氯化血红素组(140 $\mu\text{mol/L}$)和毛蕊异黄酮组(20 $\mu\text{mol/L}$),干预 24 h。

2.3 CCK8 法检测细胞存活率 取对数期 PC12 细胞,以每孔 8×10^3 个的密度接种于 96 孔板中,培养贴壁后,按“2.2”项下分组处理,24 h 后每孔加入 10 μL CCK8,在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中孵育 3 h,于 450 nm 波长处检测吸光度,计算细胞存活率。每组设置 5 个复孔,重复 3 次。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取对数期 PC12 细胞,以每孔 1×10^5 个的密度接种于 12 孔板中,培养贴壁后,按“2.2”项下分组处理,24 h 后弃培养基,用 PBS 清洗 2 次,收集细胞悬液至 1.5 mL 离心管后 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min,加入 500 μL 的 Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液,每管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 后轻轻混匀,室温避光孵育 10 min 后上机检测。

2.5 RT-qPCR 法检测细胞 *Bcl-2*、*Bax* mRNA 表达 收集干预 24 h 后的各组细胞,按 FastPure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒说明书提取总 RNA,使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 配置 20 μL 反应体系进行总 RNA 逆转录,使用 Premix Pro Taq HS qPCR Kit 配置 20 μL PCR 反应体系进行定量 PCR 检测,引物序列见表 1。qPCR 反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目的基因 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

引物	序列
<i>Bcl-2</i>	正向 5'-GATAACGGAGGCTGGGATGC-3'
	反向 5'-ATGCACCCAGAGTGTATGCAG-3'
<i>Bax</i>	正向 5'-CACGTCTGCGGGGAGTC-3'
	反向 5'-TCGATCCTGGATGAAACCCTG-3'
<i>GAPDH</i>	正向 5'-AAGTTCAACGGCAGTCAAGG-3'
	反向 5'-GACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'

2.6 LC-MS 分析

2.6.1 细胞干预处理 取对数期 PC12 细胞,以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中,培养贴壁后,按“2.2”项下分组处理 24 h,每组设置 6 个复孔。

2.6.2 细胞代谢物萃取 收集细胞于 1.5 mL EP 管中,用 PBS 清洗 2 次后弃上清液。每管加入 1 mL 乙腈-甲醇(1:1)混合液,涡旋 1 min 后在冰浴下用细胞破碎仪(功率 300 W,每次超声 3~5 s,间隔 30 s,重复 4~5 次)进行破碎。将样品放置于 -20 °C 冰箱 4 h 后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液置于上样瓶中用于非靶向 LC-MS 代谢组学分析。质控样品(QC)从待测样本中各取 10 μL 混

匀, 即得。

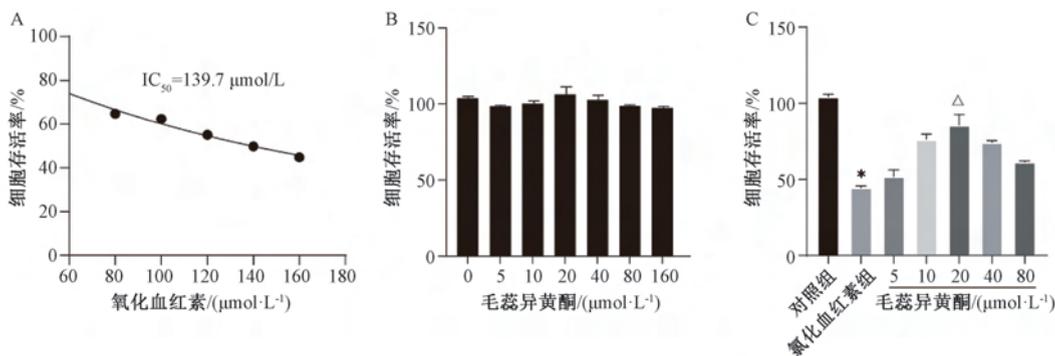
2.6.3 LC-MS 条件 采用 AB Triple TOF 6600 质谱仪进行样本一级、二级谱图的采集。电喷雾电离 (ESI); 正离子和负离子模式; Gas1 (60 psi, 1 psi = 6.895 kPa), Gas2 (60 psi), CUR (30 psi), T (600 °C), ISVF (± 5 500 V); 一级质荷比检测范围 60~1 000 Da, 二级子离子质荷比检测范围 25~1 000 Da; 一级质谱扫描累积时间 0.20 s/spectra, 二级质谱扫描累积时间 0.05 s/spectra; 二级质谱采用数据依赖型采集模式 (IDA) 获得, 并且采用峰强度值筛选模式, DP (± 60 V), 碰撞能量 (35 ± 15) eV。IDA 设置为动态排除同位素离子范围 4 Da, 每次扫描采集 10 个碎片图谱。

2.7 统计学分析 数据经 ProteoWizard 3.0 软件转换成 mzXML 格式, 然后采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。对 XCMS 提取到的数据首先进行代谢物结构鉴定和数据预处理, 然后评估实验数据质量。使用

R (version 4.3.1) 软件进行数据分析 (包括单变量统计分析、多维统计分析、差异代谢物筛选、差异代谢物相关性分析、KEGG 通路分析等)。所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的 PC12 细胞损伤的影响 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 氯化血红素组细胞存活率呈剂量依赖性降低, IC_{50} 为 139.7 $\mu\text{mol/L}$, 见图 1A。与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 毛蕊异黄酮浓度为 5~160 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞的存活率影响均较小, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1B。与对照组比较, 氯化血红素组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 与氯化血红素组比较, 5~80 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮均可提高细胞存活率, 其中 20 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊异黄酮组细胞存活率最高 ($P < 0.05$), 见图 1C。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与氯化血红素组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的 PC12 细胞损伤的抑制 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

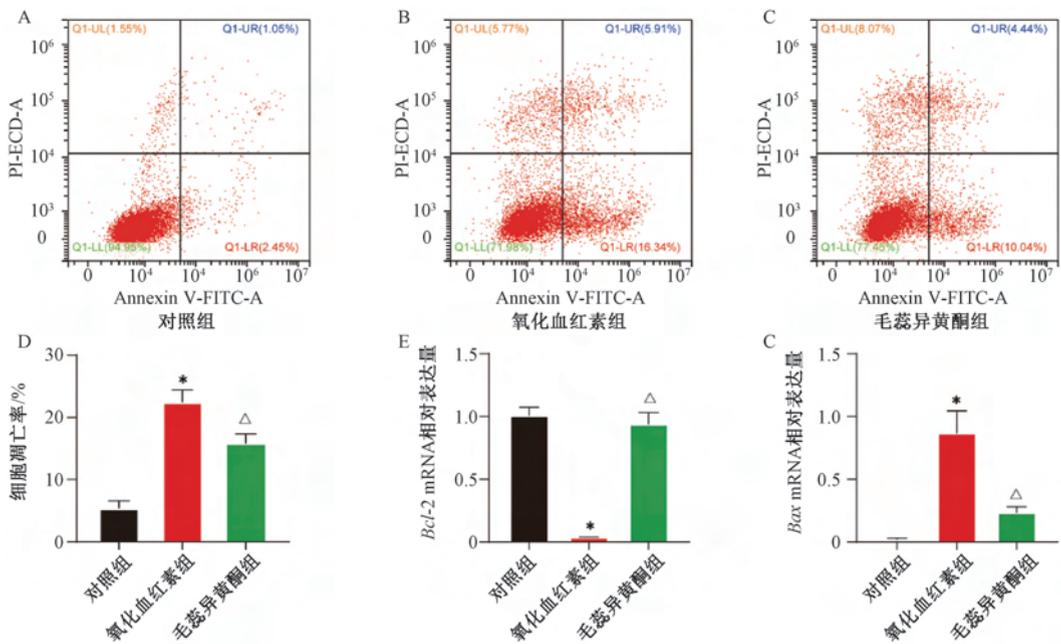
3.2 毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 与对照组比较, 氯化血红素组 PC12 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与氯化血红素组比较, 毛蕊异黄酮组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 见图 2A~2D。与对照组比较, 氯化血红素组细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), *Bax* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与氯化血红素组比较, 毛蕊异黄酮组 *Bcl-2* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), *Bax* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 见图 2E~2F。

3.3 非靶向代谢组学多元统计分析 共鉴定代谢产物 693 个, 其中正离子模式下有 603 个, 负离子模式下有 90 个, 代谢物共涉及 12 类, 其中种类最多的是脂质和脂质衍生物, 约占 47.186%, 见图 3A。将峰面积经共峰面积归一化后行 PCA 分析, 结果显示 QC 样本紧密聚集在一起, 实验重复性较好, 3 组之间的代谢特征具有可比性, 其中氯化血红素组及毛蕊异黄酮组各有 1 个离群值, 剔除后进行进一步分析, 见图 3B。OPLS-DA 分析显示对照组与氯化血红素组间可区分 ($R^2 X = 0.691, Q^2 = 0.89$), 见图 3C; 经 200 次置换检验, 可见模型不存在过拟合现象, 模型稳健性良好, 见图 3D。毛蕊异黄酮组与氯化血红素组间也可以区分 ($R^2 X = 0.557, Q^2 = 0.571$), 见图 2E; 经 200 次置换检验,

可见模型不存在过拟合现象, 模型稳健性良好, 见图 3F。

3.4 差异代谢物的筛选 以 OPLS-DA VIP > 1 、 P value < 0.05 和变异倍数 (FC) > 2 或小于 0.5 作为筛选标准对代谢物进行进一步筛选。在对照组与氯化血红素组间共筛选出 115 个差异代谢物, 其中相对含量升高的有 20 个, 降低的有 95 个; 在氯化血红素组与毛蕊异黄酮组间共筛选出 15 个差异代谢物, 其中相对含量升高的有 11 个, 降低的有 4 个, 见图 4A~4B。通过进一步分析发现, 三组间共有具有统计学意义变化的差异代谢产物有 10 个, 主要为脂质和脂质衍生物 6 个, 分别为月桂酰左旋肉碱、*N*-棕榈酰牛磺酸、鲨肝醇、磷脂酰胆碱 (36:2)、维生素 E、*D*-苏式-鞘胺醇-1-磷酸; 核苷、核苷酸和类似物 2 个, 分别为 5'-磷酸腺苷 (APS) 和单磷酸腺苷 (AMP); 有机氮化合物双硫仑和有机杂环化合物次黄嘌呤, 见图 4C1~4C10、表 2。

3.5 差异代谢通路分析 通过使用 VIP 值 > 1 , $P < 0.05$ 作为筛选条件分别富集对照组与氯化血红素组以及氯化血红素组与毛蕊异黄酮组之间的代谢通路。结果显示, 对照组与氯化血红素组之间富集的主要通路有嘌呤代谢、鞘脂代谢、谷胱甘肽代谢等, 见图 5A; 氯化血红素组与毛蕊异黄酮组之间富集的主要通路有嘌呤代谢、硫代谢及泛醌和其



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与氯化血红素组比较， $\Delta P < 0.05$ 。

图2 毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的PC12细胞凋亡的抑制 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

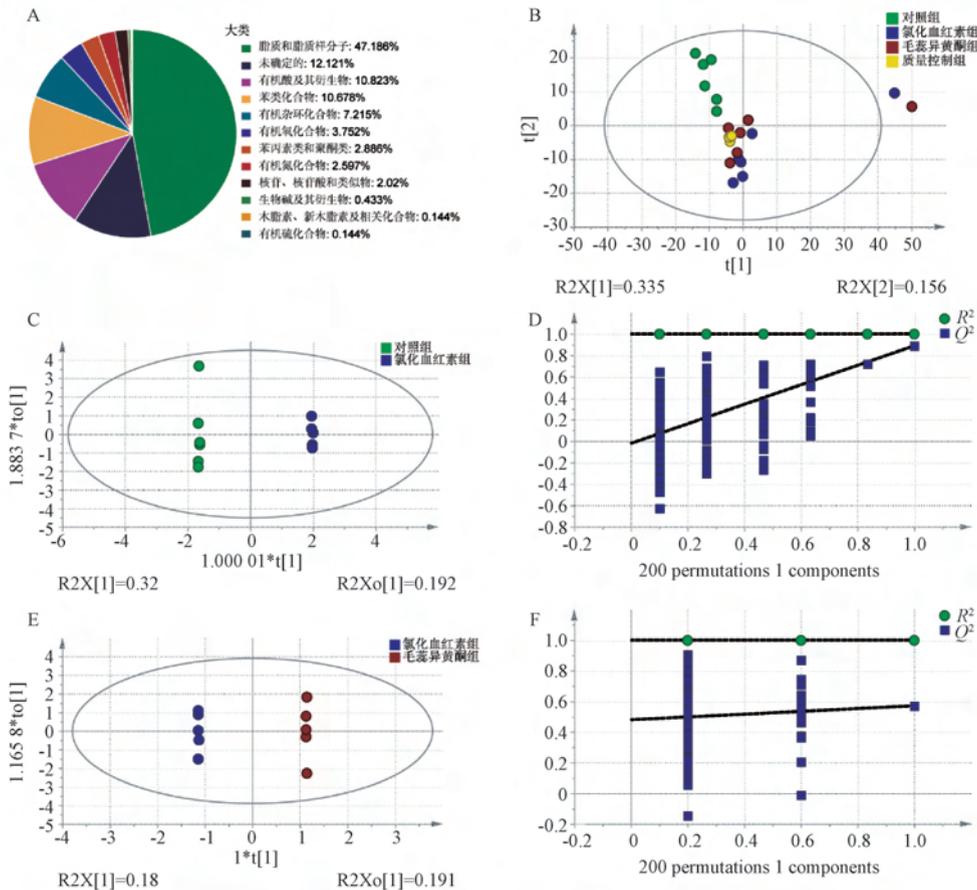


图3 非靶代谢组学多元统计分析 ($n = 6$)

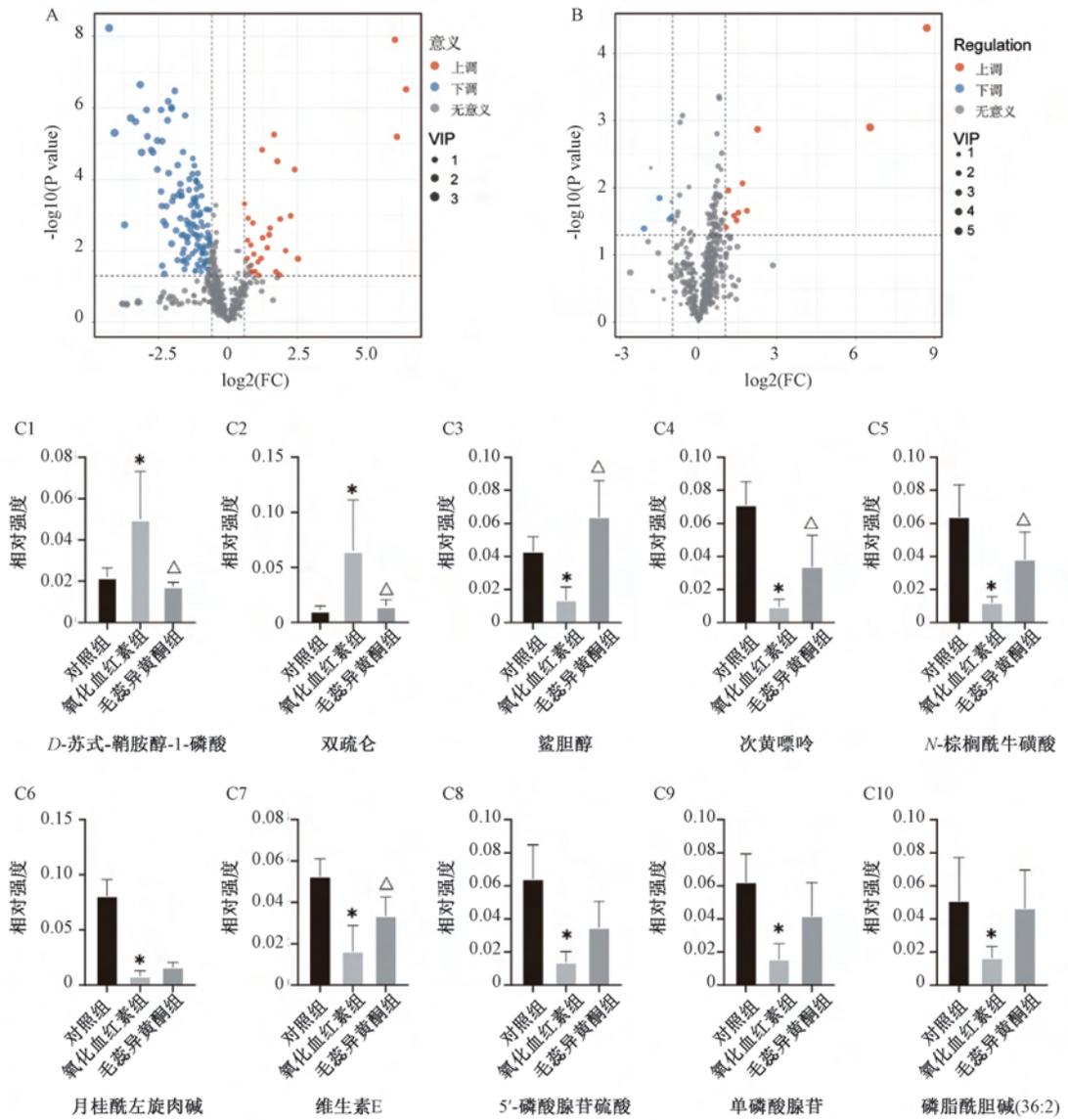
他萜类化合物-甙的生物合成等，见图5B。3组间共有的具有统计学意义的代谢通路是嘌呤代谢。

4 讨论

本研究显示毛蕊异黄酮可通过抑制细胞凋亡减轻氯化

血红素诱导的细胞损伤，进一步通过非靶代谢组学研究发现，有多种差异代谢产物可能通过嘌呤代谢通路参与毛蕊异黄酮对氯化血红素诱导的细胞损伤的保护机制。

脂质是较复杂的代谢分子，在细胞内膜、质膜和微结



注：与氯化血红素组比较，* $P < 0.05$ ， $\Delta P < 0.05$ 。

图4 差异代谢物的筛选 (n=6)

表2 筛选的10个差异代谢物相对强度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

名称	m/z	保留时间/s	对照组	氯化血红素组	毛蕊异黄酮组	F 值	P 值
次黄嘌呤	137.045	81.451	0.071±0.013	0.009±0.004	0.034±0.017	28.11	<0.001
双硫仑	319.039	419.713	0.011±0.003	0.065±0.041	0.015±0.005	7.22	0.008
月桂酰左旋肉碱	344.278	402.782	0.081±0.013	0.008±0.004	0.016±0.004	92.32	<0.001
鲨肝醇	345.336	746.122	0.043±0.008	0.014±0.007	0.064±0.020	16.02	<0.001
D-苏式-鞘胺醇-1-磷酸	362.241	239.796	0.022±0.004	0.050±0.021	0.018±0.002	9.105	0.003
N-棕榈酰牛磺酸	362.237	710.082	0.064±0.017	0.012±0.003	0.038±0.015	16.18	<0.001
维生素E	430.387	821.541	0.053±0.008	0.016±0.011	0.033±0.008	17.62	<0.001
5'-磷酸腺苷	346.054	75.811	0.062±0.016	0.015±0.009	0.042±0.018	11.23	0.002
单磷酸腺苷	348.070	77.298	0.064±0.019	0.014±0.006	0.035±0.014	13.85	<0.001
磷脂酰胆碱(36:2)	772.621	1 090.685	0.051±0.024	0.016±0.006	0.046±0.021	4.16	0.040

构域中广泛存在，这决定了其广泛的物理性质，且与细胞功能和体内平衡密切相关，脂质代谢紊乱与多种疾病有关^[9-10]。本研究筛选的差异代谢物大部分为脂质类代谢物，既往研究发现脂质参与细胞凋亡的所有阶段，其可通过触

发内质网应激反应来启动并转导细胞凋亡信号^[11-12]。筛选出的脂质代谢物中的维生素E是众所周知的强效脂溶性天然抗氧化剂，不仅具有抗氧化活性，还具有促氧化、细胞信号传导和基因调控功能^[13]。研究发现，维生素E可使缺

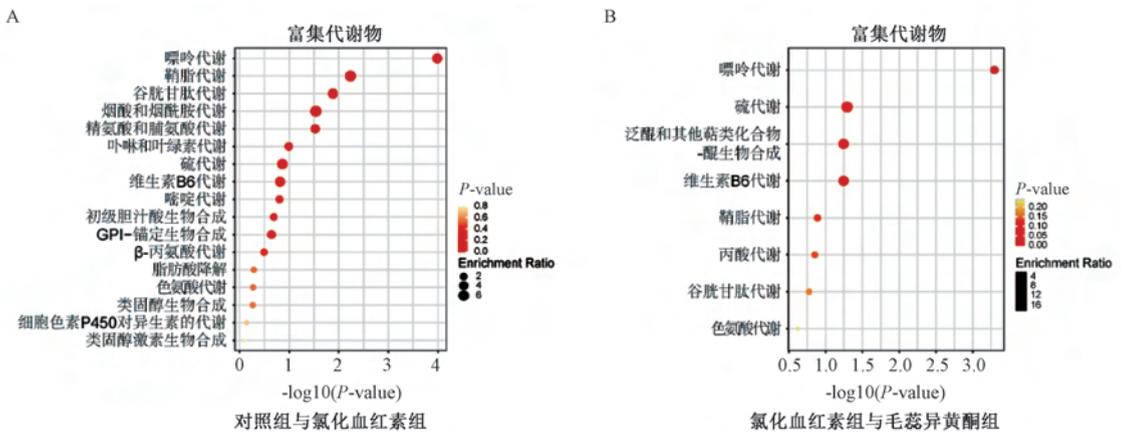


图5 差异代谢物通路分析

性卒中的风险降低 10%，但会使出血性卒中的风险增加 22%，对总体卒中的风险没有影响^[14]。针对脑卒中亚型的研究显示，维生素 E 可降低缺血性卒中的风险，但对出血性卒中的风险没有显著影响^[15-16]。β-肌丙酸是 SLC6A8 转运体抑制剂，会增加脂质代谢，在肌肉中可作为线粒体生物形成的非适应性刺激剂。研究发现，β-肌丙酸会提高促进线粒体增殖的几种关键抗氧化剂和代谢酶的表达以及激活 Nrf2/ARE 信号通路，其可能就是通过氧化应激机制发挥神经保护作用^[17]。

通路富集分析发现，嘌呤代谢可能是毛蕊异黄酮抑制脑出血病理过程的重要通路，其在稳定神经系统功能中发挥着至关重要的作用。嘌呤是最丰富的代谢底物之一，除了作为 DNA 和 RNA 的组成部分外，嘌呤对于细胞存活和增殖也是必需的^[18]。一直以来，腺嘌呤代谢被认为是原核生物和真核生物相互联系最紧密、调节最精确的代谢回路之一。嘌呤代谢失调与氧化应激有关，氧化应激导致许多人类疾病和紊乱^[19-20]。本研究发现嘌呤代谢途径的重要代谢物 5'-磷酸腺苷 (APS) 和单磷酸腺苷 (AMP) 含量在氯化血红素组中下降，经毛蕊异黄酮干预后含量上升。细胞生命过程中，三磷酸腺苷 (ATP) 经 ATP 磷酸化酶催化形成 APS 进一步参与功能调节。AMP 是一种在核糖核酸中发现的核苷酸，由磷酸盐官能团、戊糖核酸糖及碱基腺嘌呤组成。AMP 可结合磷酸基团形成 ADP 和 ATP 信号，也是 ATP 完全水解的产物。细胞信号转导中 AMP 可作为 AMPK 激酶的激活剂广泛参与细胞功能中。研究发现，嘌呤代谢在精神类疾病的发生与发展过程中具有重要作用，抑郁症动物模型和患者的该代谢途径出现明显失调^[21]，但是其在脑出血发生发展中的作用机制研究还较少。

综上所述，毛蕊异黄酮可抑制氯化血红素诱导的 PC12 细胞凋亡，可能通过调节嘌呤代谢发挥保护作用，但仍需进一步通过动物实验及临床研究验证。

参考文献:

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence,

prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1789-1858.

[2] Hankey G J. Stroke[J]. *Lancet*, 2017, 389(10069): 641-654.
 [3] Koh S H, Park H H. Neurogenesis in stroke recovery[J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(1): 3-13.
 [4] Wu S M, Wu B, Liu M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 394-405.
 [5] 薛倩倩, 刘晓节, 李科, 等. 黄芪药材化学成分差异的研究进展 [J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(10): 1259-1263.
 [6] Deng M, Chen H J, Long J Y, et al. Calycosin: a review of its pharmacological effects and application prospects [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(7): 911-925.
 [7] Naz S, Vallgio M, García A, et al. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1353: 99-105.
 [8] Rinschen M M, Ivanisevic J, Giera M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6): 353-367.
 [9] Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, et al. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3236-3245.
 [10] 李怡萍, 杨丽丽, 郑昱, 等. 三子养亲汤对非酒精性脂肪性肝病小鼠脂质代谢紊乱的调控作用 [J]. *中成药*, 2022, 44(3): 913-917.
 [11] Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
 [12] Magtanong L, Ko P J, Dixon S J. Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(7): 1099-1109.
 [13] Ray M N, Kiyofuji M, Ozono M, et al. Vitamin E succinate mediated apoptosis by juxtaposing endoplasmic reticulum and mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2023, 1867

- (12): 130485.
- [14] Schürks M, Glynn R J, Rist P M, et al. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *BMJ*, 2010, 341: c5702.
- [15] Loh H C, Lim R, Lee K W, et al. Effects of vitamin E on stroke: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2021, 6(1): 109-120.
- [16] 兰欣, 党少农, 赵亚玲, 等. 维生素E补充对心脑血管疾病影响随机对照试验 meta 分析[J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(11): 1497-1501.
- [17] Gureev A P, Shaforostova E A, Starkov A A, et al. β -Guanidinopropionic acid stimulates brain mitochondria biogenesis and alters cognitive behavior in nondiseased mid-age mice[J]. *J Exp Neurosci*, 2018, 12: 1179069518766524.
- [18] Pedley A M, Benkovic S J. A new view into the regulation of purine metabolism: the purinosome [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(2): 141-154.
- [19] Mádrová L, Krijt M, Barešová V, et al. Mass spectrometric analysis of purine *de novo* biosynthesis intermediates [J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208947.
- [20] Nyhan W L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism [J]. *Mol Genet Metab*, 2005, 86(1-2): 25-33.
- [21] Liu L X, Zhou X Y, Zhang Y Q, et al. Hippocampal metabolic differences implicate distinctions between physical and psychological stress in four rat models of depression [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 4.

紫苏汤对抗生素诱导的肠道菌群失调小鼠菌群多样性及结构的影响

席素曼¹, 王亚静^{1*}, 赵鑫^{2*}, 苗小雨¹, 张紫千¹, 赵森¹

(1. 天津中医药大学现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 301617; 2. 天津中医药大学方剂学教育部重点实验室, 天津 301617)

摘要: **目的** 探讨紫苏汤对肠道菌群失调小鼠多样性及组成的影响。**方法** 将小鼠随机分为正常组、模型组及紫苏汤低、高剂量组, 每组 8 只。除正常组外, 其余组连续灌胃给予抗生素 8 d 后, 再分别灌胃给予等量无菌水和紫苏汤溶液 1.82、3.64 g/kg 8 d, 记录小鼠体质量、摄食量、饮水量的变化。收集各组新鲜粪便样本, 进行 16S rRNA 高通量测序, 对肠道菌群多样性、物种差异性进行分析。**结果** 抗生素干预 8 d 后, 小鼠精神状态较萎靡, 有稀便现象出现, 摄食量减少, 饮水量增多; 而停用抗生素后, 小鼠摄食量增多, 饮水量减少; 紫苏汤可使小鼠精神状态恢复, 减轻稀便, 改善摄食量和饮水量。肠道菌群多样性分析显示, 抗生素干预后, 小鼠肠道菌群多样性降低, 而紫苏汤可使小鼠肠道菌群丰富度和多样性增加, 菌群结构向对照组靠近。门水平分析显示, 紫苏汤干预后, 小鼠肠道中厚壁菌门丰度增加, 变形菌门和疣微菌门丰度降低。属水平分析显示, 紫苏汤干预后, 小鼠肠道中乳杆菌属丰度增加, 克雷伯氏菌属、埃希氏-志贺氏菌属及韦荣氏球菌属丰度降低。**结论** 紫苏汤对肠道菌群失调有积极作用, 可改善小鼠的肠道菌群结构, 抑制致病菌并促进有益菌。

关键词: 紫苏汤; 肠道菌群; 16S rRNA 测序

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2079-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.052

感染后咳嗽是指当呼吸道感染的急性期症状消失后, 咳嗽仍迁延不愈^[1-2]。感染后咳嗽常为自限性疾病, 可自行缓解, 但部分患者仍咳嗽顽固, 甚至发展为慢性咳嗽, 近年此病患病率逐渐升高^[3]。对出现感染后咳嗽症状患者的微生物群进行评估时发现其肠道菌群紊乱, 总体细菌多样性较低, 菌群结构发生改变^[4-6]。且有研究表明, 感染后咳

嗽存在肺部与肠道菌群相互作用的“肠-肺轴”, 影响肠道与肺部的健康^[7-10]。许多肠道微生物也可以参与多种感染后咳嗽的治疗, 例如乳杆菌^[11]、双歧杆菌^[12]、链球菌^[13]、肠球菌^[14]等。

紫苏汤收载于宋代的《太平惠民和剂局方》, 由紫苏叶、乌梅、苦杏仁、甘草组成^[15-18], 其在临床上对感染后

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803959); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-C-202009); 天津市科技计划项目 (19ZYPTJC00060, 18ZXXYSY00130)

作者简介: 席素曼 (1998—), 女, 硕士生, 从事药物制剂与新药开发研究。Tel: 15128896265, E-mail: 810707020@qq.com

* **通信作者:** 王亚静 (1969—), 女, 研究员, 从事药物制剂与新药开发研究。Tel: (022) 59596169, E-mail: yajing022@163.com

赵鑫 (1989—), 女, 博士, 副研究员, 从事中药微生物组学研究。Tel: 15510969668, E-mail: x.zhao26@tjutc.edu.cn