

## 蕨麻抗高原缺氧生物标志物与作用机制的研究

张冠华<sup>1</sup> 董化江<sup>3</sup> 杨晴晴<sup>1</sup> 李灵芝<sup>1</sup> 陈立军<sup>2</sup>

- 1 中国人民武装警察部队后勤学院卫生勤务系军事药学教研室
- 2 中国人民武装警察部队后勤学院卫生勤务系人体机能学教研室
- 3 中国人民武装警察部队后勤学院卫生勤务系人体解剖学教研室

DOI:10.12238/bmtr.v5i5.6501

**[摘要]** 目的: 研究蕨麻抗高原缺氧损伤生物标志物与作用机制。方法: 通过超高效液相-四级杆-轨道阱高分辨质谱联用(Ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole exactive mass spectrometry, UPLC-Q-Exactive MS)代谢组学技术,结合多元数据统计筛选蕨麻抗高原缺氧损伤大鼠血清的潜在生物标志物,进一步分析相关代谢通路。结果: 正、负离子模式下,QC样本集聚良好,表明仪器分析系统稳定性良好。对照组、实验组及蕨麻干预组3组样本能显著区分开,表明各组间血清代谢轮廓有明显差异,样本全部处于95%置信区间内。通过设定VIP值>1、P<0.05、FC>2且<1/2得到差异代谢物,进一步筛选蕨麻干预后有回调作用的物质,蕨麻给药治疗后,黄嘌呤核苷、马尿酸、鹅肌肽等26个差异代谢物较实验组回调,说明这26个代谢成分可能为蕨麻抗高原缺氧的血清生物标志物。结论: 蕨麻抗高原缺氧损伤可能与26个生物标志物与5个代谢通路的代谢途径调控有关,为临床进一步应用该药提供参考。

**[关键词]** 代谢组学; 蕨麻; 抗高原缺氧; 作用机制

中图分类号: R9 文献标识码: A

### A study on the biomarkers and mechanism of action of fern hemp against high-altitude hypoxia

Guanhua Zhang<sup>1</sup> Huajiang Dong<sup>3</sup> Qingqing Yang<sup>1</sup> Lingzhi Li<sup>1</sup> Lijun Chen<sup>2</sup>

1 Military Pharmacy Teaching and Research Office of the Health Service Department of the Logistics College of the Chinese People's Armed Police Force

2 Teaching and Research Office of Human Functionality, Department of Health Service, Logistics College of the Chinese People's Armed Police Force

3 Human Anatomy Teaching and Research Office of the Health Service Department of the Logistics College of the Chinese People's Armed Police Force

**[Abstract]** Objective: To study the biomarkers and mechanism of action of fern hemp against high-altitude hypoxia injury. Method: Ultra high performance liquid chromatography quadrupole active mass spectrometry was used,UPLC-Q-Exactive MS metabolomics technology, combined with multivariate data statistics, was used to screen potential biomarkers of fern hemp in the serum of rats with high-altitude hypoxia injury, and further analyze relevant metabolic pathways. Result: In both positive and negative ion modes, QC samples clustered well, indicating good stability of the instrument analysis system. The three groups of samples, namely the control group, experimental group, and fern hemp intervention group, were significantly distinguished, indicating significant differences in serum metabolic profiles among the groups. All samples were within the 95% confidence interval. By setting VIP values>1, P<0.05, FC>2 and<1/2, differential metabolites were obtained to further screen for substances with a callback effect after intervention with Fern Ma. After treatment with Fern Ma, 26 differential metabolites such as xanthine nucleoside, hippuric acid, and goose myosin were compared with the experimental group, indicating that these 26 metabolites may be serum biomarkers for Fern Ma's anti high-altitude hypoxia effect. Conclusion: The anti high-altitude hypoxia injury effect of Fern Ma may be related to the regulation of 26 biomarkers and 5 metabolic pathways, providing reference for further clinical application of this drug.

**[Keywords]** Metabolomics; Fern hemp; Anti high-altitude hypoxia; Mechanism of action

## 前言

近年来反恐、维稳、抗震救灾等诸多应急任务频发,军队批量人群急进高原次数增多,规模偏大,任务偏重<sup>[1-2]</sup>。而高原环境之“特殊”在于所处高原环境中氧分压下降,导致氧气的供应不足<sup>[3]</sup>。蕨麻是蔷薇科委陵菜属植物鹅绒委陵菜的干燥块根,课题组前期研究发现,蕨麻在抗高原缺氧方面显示出较好的疗效<sup>[4-5]</sup>。本研究采用低压低氧动物实验舱制备高原缺氧模型,首次运用UPLC-Q-Exactive MS探讨蕨麻对抗高原缺氧方面的保护作用。并通过代谢组学检测通路变化,初步揭示其可能的作用机制,以期为临床诊疗上蕨麻的应用提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康SPF级SD(sprague dawley)大鼠24只,体重140-160g,购自天津市奥臣实验动物销售有限公司;温度20-25℃,自由进食及饮水,适应性喂养一周。

### 1.2 实验药物与试剂

蕨麻购自青海;色谱级甲醇(67-56-1)、色谱级乙腈(75-05-8)购于上海安谱实验科技股份有限公司;色谱级乙酸铵(631-61-8)购于美国Sigma-Aldrich有限公司;色谱级氨水(1336-21-6)购于美国Fisher Chemical有限公司;超纯水购于屈臣氏。

### 1.3 主要仪器

DS850-I动物实验舱(潍坊华信氧业有限公司);Vanquish超高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher公司);Thermo Q Exactive HFX质谱仪(美国Thermo Fisher公司);BSA124S-CW电子天平(Sartorius公司);JXFSTPRP-24研磨仪(上海净信科技有限公司);Heraeus Fresco17离心机(美国ThermoFisher公司);PS-60AL超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司)。

### 1.4 动物造模及给药

洁净级雄性SD大鼠24只,随机分为常氧对照组,减压缺氧模型组,蕨麻乙醇提取物治疗组(大鼠给药剂量为 $3.6\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$ ),每组8只。连续灌胃给药2周。减压缺氧实验组与给药干预组在最后1次灌胃后置于低压缺氧舱,15min内使舱内大气压降至 $-0.06\text{Mpa}$ (相当于海拔7000m上升速度:10m/s,下降速度:20m/s,温度:25±3℃)。常氧对照组于舱外正常饲养,各组正常饮水进食。实验期间实时观察并记录大鼠行为状态。持续缺氧24h后,15min内使舱内大气压回升至常压,把大鼠迅速从舱内取出,腹腔注射10%水合氯醛(1ml/100g)麻醉大鼠,于解剖台上用眼科剪自腹腔至胸腔剪开,腹主动脉取血(每只大鼠6-8ml),静置2h,4℃、3000rpm离心10min,分离血清,分装,-80℃冰箱中保存备用。

### 1.5 大鼠一般状态观察

观察记录大鼠在动物实验舱内的精神状态、身体状况以及行为变化。

### 1.6 UHPLC-Q-Exactive MS测定

#### 1.6.1 血清样本制备



图1 DS850-I动物实验舱(潍坊华信氧业有限公司)

移取-80℃下保存的血清样本50 μL于1.5ml EP管中,加入200 μL提取液(甲醇:乙腈=1:1(V/V),含同位素标记内标混合物)充分涡旋混匀30s后放入冰水浴超声提取10min,-40℃静置1h以充分沉淀蛋白。静置结束后于4℃,12000rpm(离心力13800(×g),半径8.6cm)离心15min,取上清于进样瓶中上机检测;所有样品另取等量上清混合成质控样品(QC)样品上机检测。

#### 1.6.2 色谱条件

使用Vanquish(Thermo Fisher Scientific)超高效液相色谱仪,通过Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1mm×100mm,1.7 μm)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱A相为水相,含25mmol/L乙酸铵和25mmol/L氨水,B相为乙腈。样品盘温度:4℃,进样体积:3 μL。

#### 1.6.3 质谱条件

样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式。Thermo Q Exactive HFX质谱仪能够在控制软件(Xcalibur, Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:一级离子检测方式为全扫描(Full Scan),分辨率为60000,MS/MS分辨率:7500。正负模式下的喷雾电压分别为3.6kV(正)或-3.2kV(负)。鞘气流速:30Arb,辅助气体流量:25Arb,毛细管温度为350℃,辅助气加热温度为375℃。

#### 1.6.4 数据处理和统计

原始数据经ProteoWizard软件转成mzXML格式后,使用自主编写的R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐和积

分等处理, 然后与BiotreeDB (V2. 1) 自建二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的Cutoff值设为0. 3。通过无监督的主成分分析 (PCA) 和有监督的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 对代谢物数据进行分析。将满足标准的化合物作为差异代谢物, 进一步筛选蕨麻干预后有回调作用的物质为生物标志物, 最后进行代谢通路分析。

## 2 结果

### 2. 1 大鼠一般状态

正常对照组大鼠精神状态良好, 呼吸频率稳定, 行动活跃, 进食饮水正常, 背毛柔软平整。缺氧模型组大鼠精神萎靡, 蜷卧聚团, 呼吸频率加快, 活动明显减少, 进食饮水显著次数减少, 背毛竖立。与模型组比较, 蕨麻给药可改善大鼠精神状态, 活动次数、进食饮水相对增多, 背毛相对平整。

### 2. 2 蕨麻对大鼠血清代谢物的影响

#### 2. 2. 1 PCA分析

多元变量统计分析包括主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 是将一组观测的可能相关变量, 通过正交变换转换为线性不相关变量 (即主成分) 的统计方法。使用SIMCA软件 (V16. 0. 2, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden), 对样本正、负离子模式数据进行对数 (LOG) 转换加中心化 (CTR) 格式化处理, 进行自动建模分析可以获得相应的散点图, 即PCA得分散点图 (见图2), 所有样本都置于95%置信区间 (Hotelling's T squared ellipse) 内。正、负离子模式下, QC样本集聚良好, 表明仪器分析系统稳定性良好。

#### 2. 2. 2 OPLS-DA分析

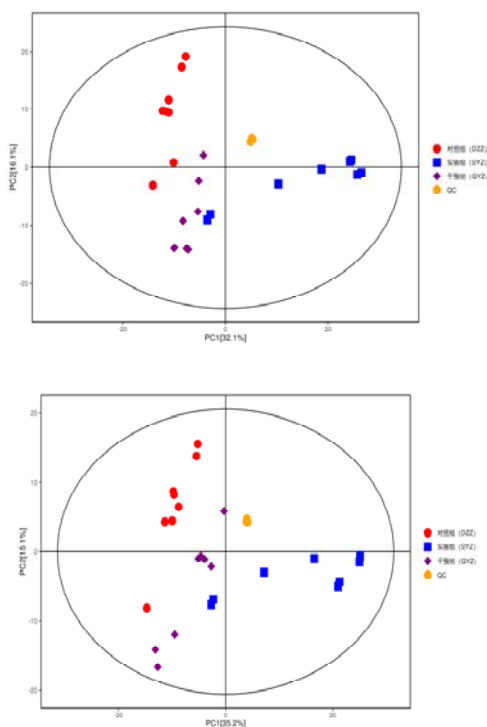


图2 正负离子模式下样本 (包括QC样本) 的PCA得分散点图

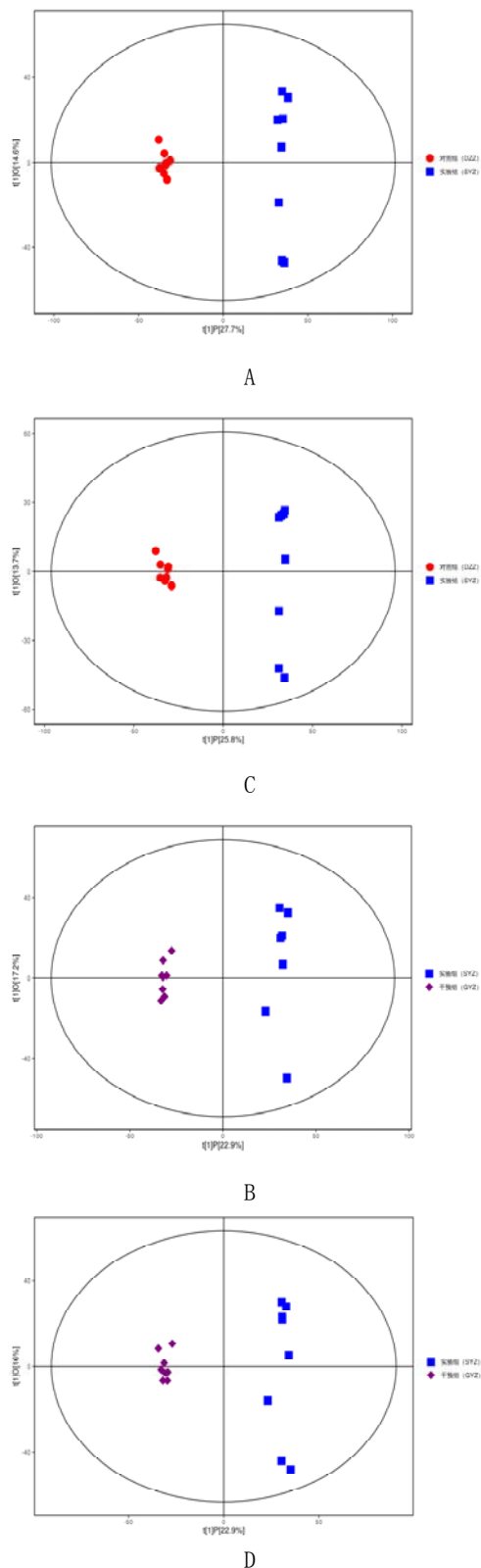


图3正负离子模式下各组大鼠血清样本的OPLS-DA图 (注: A—ESI+模式下对照组和实验组组间比较; B—ESI+模式下实验组和干预组组间比较; C—ESI-模式下对照组和实验组组间比较; D—ESI-模式下实验组和干预组组间比较。)

正交偏最小二乘法-判别分析 (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis, OPLS-DA) 可以过滤掉代谢物中与分类变量不相关的正交变量, 并对非正交变量和正交变量分别分析, 从而获取更加可靠的代谢物的组间差异与实验组的相关程度信息。使用SIMCA软件 (V16. 0. 2, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden) 对数据进行对数 (LOG) 转换加UV格式化处理后, 首先对第一主成分进行OPLS-DA建模分析。为了验证模型的质量, 用7折交叉验证 (7-fold cross validation) 进行检验; 然后用交叉验证后得到的R<sub>Y</sub> (模型对分类变量Y的可解释性) 和Q<sub>Y</sub> (模型的可预测性) 对模型有效性进行评判, 从OPLS-DA得分图 (见图3) 的结果可以看出, 正、负离子模式下, 对照组、实验组及蕨麻干预组3组样本能显著区分开, 表明各组间血清代谢轮廓有明显差异, 样本全部处于95%置信区内。

2. 2. 3 OPLS-DA置换检验

置换检验通过随机改变分类变量Y的排列顺序, 重复多次 (次数n=200) 建立对应的OPLS-DA模型以获取随机模型的R和Q值, 在避免检验模型的过拟合以及评估模型的稳健性上有重要作用。置换检验随机模型的Q值均小于原模型的Q值; Q的回归线与纵轴的截距小于零; 同时随着置换保留度逐渐降低, 置换的Y变量比例增大, 随机模型的Q逐渐下降。说明原模型具有良好的稳健性, 不存在过拟合现象。OPLS-DA模型验证见图4。

2. 2. 4 生物标志物的筛选

为进一步筛选生物标志物, 采用OPLS-DA模型寻找内源性物质的差异。基于上述OPLS-DA模型, 筛选OPLS-DA模型第一主成分的变量投影重要度 (Variable Importance in the Projection, VIP) > 1、t检验P < 0. 05、FC > 2且 < 1/2得到差异代谢物, 进一步筛选蕨麻干预后有回调作用的物质, 得到26个生物标志物。详细信息见表1。

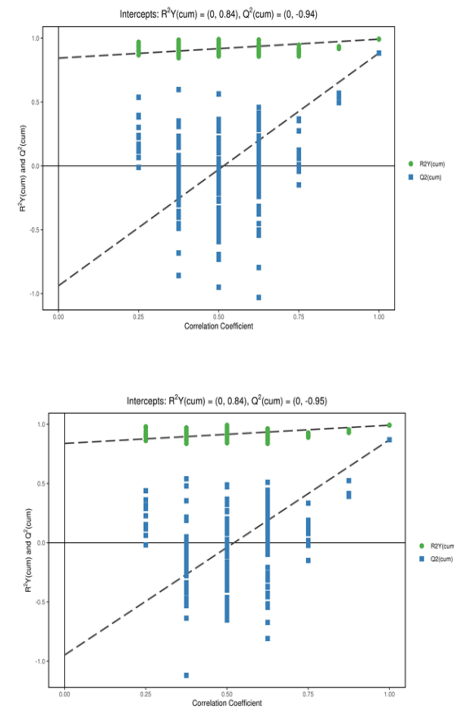
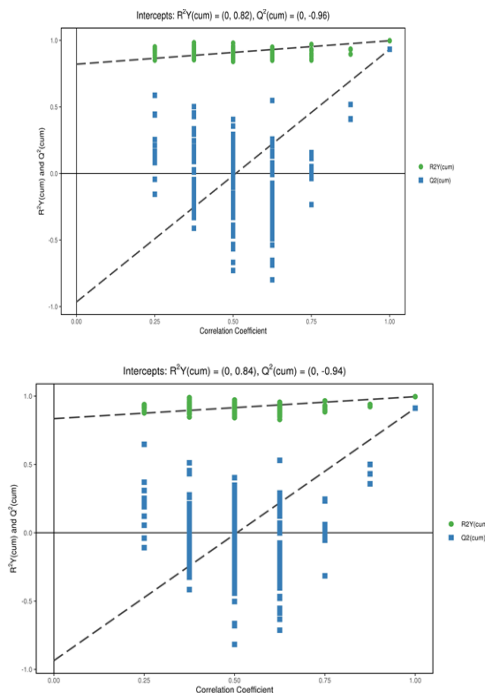


图4 正负离子模式下各组大鼠血清样本的OPLS-DA置换检验 (注: A—ESI+模式下对照组和实验组组间比较; B—ESI+模式下实验组和干预组组间比较; C—ESI-模式下对照组和实验组组间比较; D—ESI-模式下实验组和干预组组间比较。)

将26个生物标志物进行通路富集分析, 发现共干扰了5个代谢通路, 包括丙氨酸代谢, 淀粉和蔗糖代谢, 半乳糖代谢, 嘧啶代谢, 嘌呤代谢, 其中以淀粉和蔗糖代谢最为显著, 见图5。

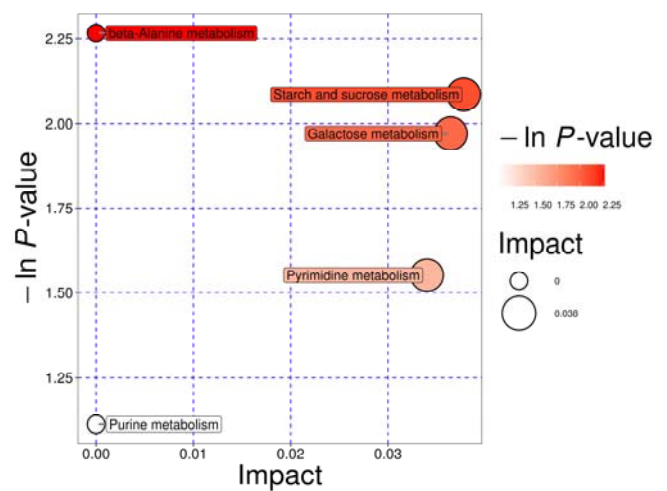


图5 生物标志物代谢通路网络图

3 讨论

急性高原病 (AMS) 是由高原低氧环境诱发的一系列病理学结构损伤及功能紊乱的一种特发性疾病征<sup>[6]</sup>。在过去的半个世纪里, AMS的药物治疗在很大程度上依赖于碳酸酐酶 (CA) 抑制剂 (如乙酰唑胺) 和皮质类固醇 (如地塞米松)。然而, 这些化学药物

表1 大鼠血清生物标志物的鉴定

id	MS2 name	HMDB	Chinese Name	Chinese Class	CAS	KEGG COMPOUND ID
1	3-(3-Methylbutylidene)-1(3H)-isobenzofuranone	HMDB0031663	3-(3-甲基亚丁基)-1(3H)-异苯并呋喃酮	有机杂环化合物		
2	1-Pyrrolidine	HMDB0012497	3,4-二氢-2H-吡咯	有机杂环化合物	5724-81-2	C15668
3	Prostaglandin A2	HMDB0002752	前列腺素A2	类花生酸类	13345-50-1	C05953
4	Xanthosine	HMDB0000299	黄嘌呤核苷	核苷类	146-80-5	C01762
5	Hippuric acid	HMDB0000714	马尿酸	酚酸	495-69-2	C01586
6	Anserine	HMDB0000194	鹅肌肽	小肽	584-85-0	C01262
8	4,5-Dihydropiperlonguminine	HMDB0041488	二氢萃麦明宁碱	有机杂环化合物	23512-53-0	
9	N-Acetyl-L-phenylalanine	HMDB0000512	N-乙酰-L-苯丙氨酸	小肽	2018-61-3	C03519
10	Lepidine F	HMDB0033094	亮氨酸F	芳香类化合物		
11	D-Glucose	HMDB0000122	D-葡萄糖	糖类	50-99-7	C00031
12	Isoleucyl-Alanine	HMDB0028900	异亮氨酸丙氨酸	氨基酸		
14	4-Deoxyphysalolactone	HMDB0034346	4-脱氧乳内酯	甾体	78286-00-7	
15	N1,N10-Diferuloylspermidine	HMDB0033471	N1, N10-二氧亚精胺	木脂素	70185-61-4	
16	1-(2-Thienyl)-1-heptanone	HMDB0040241	1-(2-噻吩)-1-庚酮	酮类	30711-40-1	
17	PC(22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z))	HMDB0008741		甘油磷脂类		C00157
18	Strobilurin A	HMDB0030420	甲基丙烯酰胺A	芳香类化合物	52110-55-1	
20	Alantolactone	HMDB0035906	土木香内酯	有机杂环化合物	546-43-0	C09289
21	Acetylpterosin C	HMDB0030764	乙酰腺素C	苯环型化合物		
22	Acetyl tributyl citrate	HMDB0034159	乙酰柠檬酸三丁酯	有机酸	77-90-7	
23	Muzanzagenin	HMDB0032601	木鳖乳根素	甾体类	197080-19-6	
24	N2-Fructopyranosylarginine	HMDB0041541	N2-吡喃果糖精氨酸	氨基酸	162966-07-6	
25	Phenobarbital	HMDB0015305	苯巴比妥	其它	18420	
26	Thymine	HMDB0000262	5-甲基腺嘧啶	嘧啶系生物碱  胺类生物碱	65-71-4	C00178

有明显的毒副作用,如头痛、疲劳、恶心、呕吐、代谢性酸中毒和电解质改变等。本课题组前期研究发现,蕨麻在高原缺氧方面显示出较好的疗效。但蕨麻的整体物质基础和整体作用机制尚不明确,这也成为限制蕨麻资源综合开发和利用的瓶颈。

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴学科,是分析机体复杂体系中小分子内源性物质变化的技术。与基因组学和蛋白质组学相比,代谢组学是表征生物学事件发生后的代谢指纹,不是预测而是结果。因此,更具有准确性,是最接近表型的组学技术,以代谢组学为基础的研究方法为评价中医药的疗效和作用机制提供了新的思路。

综上所述,通过生物标志物及代谢通路生物学意义分析,蕨麻是通过多成分、多靶点、多途径共同调控的结果,符合中药多成分、多靶点、多通路协同发挥作用的观点,从而为给蕨麻抗高原缺氧的使用进一步奠定实验基础。虽然,这项研究筛选出了抗高原缺氧的生物标志物及相关代谢通路,但仅进行了定性研究,使用方法单一存在着一定的局限性,未进一步明确具体的调控机制。下一步需通过设计全面的实验,例如结合靶向代谢

组学更深刻的探讨相关机制,为藏药蕨麻资源综合开发和利用提供参考依据。

#### 【参考文献】

- [1]钟莉,张剑图.关注高原缺氧状态下的官兵“心事”[J].解放军健康,2020,(1):1.
- [2]Alexander I.R.,Jackson,Andrew F.,Cumpstey,Michael P.W.,Grocott.Acute high-altitude pathologies and their treatment[J].Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research,2020,11.
- [3]冉庄,王伟帅,孙徐川,等.新研发弥散供气住宿方舱在高原高寒环境下实地应用效果评价[J].军事医学,2021,45(4):5.
- [4]孙富增,李霞,李雅潇,等.蕨麻多酚对大鼠心肌细胞缺氧损伤的保护作用研究[J].武警后勤学院学报:医学版,2021,30(4):5.
- [5]陈飞,孙富增,吴亭桦,等.蕨麻多酚抗缺氧诱导的大鼠心肌细胞凋亡作用研究[J].中国药师,2020,23(6):6.
- [6]郑凯,李晓兰,王静.急性高原病发生相关SNP位点的筛选及分析[J].空军军医大学学报,2023,44(03):239-244.