

本文引用: 李珊, 谭知浩, 肖志葵, 熊苏慧, 罗弘杉, 谢菁琛, 林丽美. 基于GC-MS的血清代谢组学探究夏枯草茎叶酚酸抗慢性盆腔炎的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 235-244.

## 基于GC-MS的血清代谢组学探究夏枯草茎叶酚酸抗慢性盆腔炎的作用机制

李珊<sup>1,2</sup>, 谭知浩<sup>1,2</sup>, 肖志葵<sup>1,2</sup>, 熊苏慧<sup>1,2</sup>, 罗弘杉<sup>1,2</sup>, 谢菁琛<sup>1,2\*</sup>, 林丽美<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

**〔摘要〕** **目的** 基于GC-MS的血清代谢组学探究夏枯草茎叶酚酸抗慢性盆腔炎的有效成分及其作用机制。**方法** 本实验采用60只雌性大鼠, 采用混合菌液加机械损伤对40只大鼠进行慢性盆腔炎造模处理, 正常组10只大鼠不做处理, 假手术组10只大鼠只做机械损伤。造模成功后, 将模型大鼠分为模型组、康妇炎胶囊组、头孢克洛分散片组和夏枯草茎叶酚酸组, 每组10只, 连续给药21 d; 取正常组、假手术组、模型组和夏枯草茎叶酚酸组、康妇炎胶囊组、头孢克洛分散片组大鼠血清进行代谢组学分析, 并对筛选后的差异表达基因进行GO功能分析和KEGG通路富集分析。**结果** 夏枯草茎叶酚酸能修复慢性盆腔炎组织病理损伤; 代谢组学鉴定出47种代谢物, 主要以糖类、氨基酸、有机酸、脂肪酸、多元醇等多种内源性物质为主; 多因素分析表明, 夏枯草可改善炎症大鼠血清代谢产物异常。主要差异代谢通路为氨基酸代谢、抗坏血酸和醛糖二酸代谢途径, 主要差异代谢物为尿素、葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、L-赖氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸等, 还影响机体苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 抗坏血酸和醛糖二酸代谢, 苯丙氨酸代谢, 花生四烯酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。GO功能分析表明, 对激素的反应、细胞对氮化合物的反应和磷酸化的正向调节等是主要参与的生物过程。KEGG通路富集结果显示, PI3K-Akt信号通路、甲状腺激素信号通路和内分泌抵抗等为主要富集的通路。**结论** 夏枯草茎叶酚酸对慢性盆腔炎大鼠具有明显的治疗作用, 其机制可能与作用于COBT、ADH1C、MAOB等靶点, 干预PI3K-Akt信号通路、甲状腺激素信号通路和内分泌抵抗等信号通路, 引起差异代谢物变化有关。

**〔关键词〕** 夏枯草茎叶; 酚酸; 慢性盆腔炎; 血清代谢组学; 气相色谱-质谱法

**〔中图分类号〕**R284.1

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.009

## Mechanism of action of phenolic acids in the stems and leaves of *Prunella vulgaris* L. against chronic pelvic inflammatory disease based on serum metabolomics using GC-MS

LI Shan<sup>1,2</sup>, TAN Zhihao<sup>1,2</sup>, XIAO Zhikui<sup>1,2</sup>, XIONG Suhui<sup>1,2</sup>, LUO Hongshan<sup>1,2</sup>, XIE Jingchen<sup>1,2\*</sup>, LIN Limei<sup>1,2\*</sup>

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China

**〔Abstract〕 Objective** To explore the active ingredients and mechanism of action of phenolic acids in the stems and leaves of *Prunella vulgaris* L. against chronic pelvic inflammatory disease based on serum metabolomics using GC-MS. **Methods** A total of

**〔收稿日期〕**2023-06-29

**〔基金项目〕**湖南省教育厅重点项目(20A380); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ80085, 2022JJ80020); 湖南省卫生健康委员会科研计划课题项目(202113051481)。

**〔通信作者〕**\* 林丽美, 女, 博士, 教授, E-mail: lizasmile@163.com; 谢菁琛, 女, 硕士, 实验师, E-mail: 190478360@qq.com。

60 female rats were used in this experiment. Among them, 40 rats were treated with mixed bacterial liquid and mechanical injury to establish chronic pelvic inflammatory disease model, ten rats in the normal group were not treated, and ten rats in the sham-operated group were only treated with mechanical injury. After successful modeling, the rat models were subdivided into model group, Kangfuyan Capsules group (KFY group), Cefaclor Dispersible Tablets group (CEC group), and group of phenolic acids from stems and leaves of *Prunella vulgaris* L. (XKC group). Each group was administered with the corresponding medication or distilled water continuously for 21 d. The rat serum from the normal, sham-operated, model, and XKC groups, KFY group, CEC group was analyzed using metabolomics, and the differentially expressed genes after screening were analyzed by GO function and KEGG pathway enrichment. **Results** The phenolic acids in the stems and leaves of *Prunella vulgaris* L. could repair the pathological damage of chronic pelvic inflammatory tissue. Metabolomics identified 47 metabolites, mainly including carbohydrates, amino acids, organic acids, fatty acids, polyols, and other endogenous substances, and multifactor analysis showed that *Prunella vulgaris* L. could reduce the abnormal serum metabolites in the inflammatory rats. The main differential metabolic pathways are amino acid metabolism, as well as ascorbic acid and aldaric acid metabolism. The main differential metabolites are urea, gluconic acid, D-glucuronic acid, L-lysine, glycine, L-serine, L-threonine, L-proline, L-phenylalanine, etc. The disease also affected the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, ascorbic acid and aldaric acid metabolism, phenylalanine metabolism, arachidonic acid metabolism, as well as glycine, serine, and threonine metabolism. GO function analysis showed that the responses to hormones, cellular responses to nitrogen compounds, and positive regulation of phosphorylation were the main biological processes involved. KEGG pathway enrichment analysis showed that PI3K-Akt signaling pathway, thyroid hormone signaling pathway, and endocrine resistance were the main enrichment pathways. **Conclusion** The phenolic acids in the stems and leaves of *Prunella vulgaris* L. have obvious therapeutic effects on rats with chronic pelvic inflammatory disease. Its mechanism may be related to acting on COBT, ADH1C, MAOB and other targets, intervening in PI3K-Akt signaling pathway, thyroid hormone signaling pathway, endocrine resistance, etc., and causing changes in differential metabolites.

[**Keywords**] stems and leaves of *Prunella vulgaris* L.; phenolic acids; anti-chronic pelvic inflammatory disease; serum metabolomics; GC-MS

中药夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)为药食同源大宗药材,具有清泻肝火、散结消肿、明目的功效,对目赤肿痛、瘰疬、癭瘤、乳痛、乳癖、乳房胀痛等疾病具有治疗作用<sup>[1-2]</sup>。2020年版《中华人民共和国药典》规定夏枯草药用部位为果穗,而夏枯草非药用部位(茎叶)占全株植物的80%,课题组前期研究发现夏枯草茎叶成分与果穗相似,以多酚类成分为主(如迷迭香酸等),具有明确的抗炎活性<sup>[3-5]</sup>。

慢性盆腔炎为常见的妇科病症,可造成异位妊娠、不孕症和慢性盆腔疼痛等后遗症,具有病程长、发作频繁等特点,严重影响患病妇女的生活质量。中成药因其毒副作用低、疗效确切等优势广泛应用于临床慢性盆腔炎的治疗,其中含夏枯草中成药盆腔炎具有明显治疗效果<sup>[6]</sup>。基于此,课题组以夏枯草非药用部位(茎叶)为对象,探究其对慢性盆腔炎的干预作用,采用以GC-MS为主的血清代谢组学探讨其作用机制,以期扩大夏枯草非药用部位的资源利用及开发。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

60只4~5周龄SD雌性大鼠,体质量160~180g, SPF级,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK(湘)2019-0004,在湖南中医药大学实验动物中心内饲养,饲养温度为(24±1)℃,湿度为40%~60%,12h暗/光循环,普通饲料,自由饮水。实验通过湖南中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(LLBH-202112150001)。

### 1.2 药物与主要试剂

夏枯草采收于江西药材基地,经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定为唇形科植物夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)的干燥全草;康妇炎胶囊(国药准字Z20055634,山东步长神州制药有限公司,批号210213);头孢克洛分散片(国药准字H20041126,安徽省安科恒益药业有限公司,批号211209);苯甲酸雌二醇注射液2mL:4mg×10支

[四川金科药业有限公司,(2020)兽药生产证字22041号];4%多聚甲醛固定液(Biosharp 生物科技有限公司,批号:21351381);甲氧胺(批号:226904-5G)、N,O-双(三甲基硅烷基乙酰胺)(批号:15238-25ML)、吡啶(批号:270970-250ML)、2-异丙基苹果酸(批号:333115-100MG)均购自Sigma公司。

### 1.3 主要仪器

TGL20M型离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);GC-MS-QP2010型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);TDL-5-A型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);MS2型迷你振荡器(广州仪科有限公司);KQ-100DE型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 基于GC-MS的血清代谢组学分析

2.1.1 夏枯草茎叶酚酸提取 取干燥的夏枯草茎叶,剪短,粉碎,过60目筛,备用。称取夏枯草茎叶样品5 kg,加入30倍量的蒸馏水(V/m),回流提取120 min,冷却后补足减失的质量,提取3次,合并滤液,旋蒸浓缩。随后将样品过AB-8大孔树脂,分别用5倍量的纯水、50%乙醇洗脱,收集50%乙醇洗脱液,旋蒸浓缩至黏稠状,冷冻干燥后即得夏枯草茎叶酚酸。

2.1.2 造模与分组 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、夏枯草茎叶酚酸组、康妇炎胶囊组和头孢克洛分散片组,每组10只。

大鼠适应性喂养1周后,皮下注射雌二醇注射液0.2 mL/只(兽用苯甲酸雌二醇注射液),每天1次,连续5~7 d,注射期间注意观察大鼠阴道口是否充血、红肿,观察动情期。诱发大鼠动情周期后,采用人体解脲支原体:大肠埃希菌:金黄色葡萄球菌按2:2:1配制成浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/mL的混合菌液,10%水合氯醛麻醉大鼠,75%乙醇消毒大鼠下腹部,下腹部纵行切开2 cm切口,暴露子宫,用自制的诊刮器搔刮大鼠子宫,从卵巢向宫颈方向左右各注射配制完成的菌液,并用一块无菌止血海绵(0.2 cm $\times$ 0.2 cm)填于针孔处,阴道内塞一块无菌止血海绵以防腹腔内的菌液流出,术后抽取大鼠观察子宫及输卵管充血水肿情况判断造模是否成功,正常组不做任何处理,假手术组大鼠仅做开腹暴露子宫、缝合关腹处理<sup>[9]</sup>。

2.1.3 实验给药 依据临床用药剂量按体表面积折算法换算大鼠灌胃剂量,XKC组(0.405 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>夏枯草茎叶酚酸),KFY组(0.324 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>康妇炎胶囊),CEC组(0.067 5 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>头孢克洛分散片)。模型组、假手术组和正常组大鼠灌胃给予10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>蒸馏水,连续给药21 d。末次给药后,大鼠禁食不禁水24 h后麻醉,剔除下腹部毛发,75%乙醇消毒后剪开腹腔,行腹主动脉取血,取血后剪取子宫及输卵管组织。

2.1.4 血清样本处理 参考实验室建立的方法处理血清样本,方法如下:样本于4℃下解冻1 h,取100  $\mu$ L样本,加入50  $\mu$ L内标(1 mg/mL 2-异丙基苹果酸甲醇溶液),涡旋混合;加450  $\mu$ L甲醇除蛋白,涡旋混合后,静置8 min,13 000 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,取上清液400  $\mu$ L,氮气温和吹干<sup>[7]</sup>。向干燥残渣中加入50  $\mu$ L甲氧胺-吡啶(20 mg/mL),70℃下反应1 h。再加入100  $\mu$ L双三氟乙酰胺,混匀30 s,70℃下反应1 h,室温冷却2 h,样品于13 000 r/min(半径10 cm)离心8 min,取上清液100  $\mu$ L转至250  $\mu$ L内插管,装入进样瓶用于GC-MS分析检测<sup>[8]</sup>。

为确保分析系统的稳定性,本实验加入质控样本(quality control, QC),处理如下:分别吸取各个正常样本10  $\mu$ L,充分混合,按上述步骤进行衍生化处理,仪器每运行6次,则吸取一次QC样本进样检测,维持平衡。

2.1.5 GC-MS数据采集 气相质谱-色谱联用仪采集数据,色谱柱为DB-5MS石英毛细管(0.25 mm $\times$ 30 mm,0.25 m)。进样量:1  $\mu$ L,载气:氦气(99.99%),流速:1 mL/min,分流比50:1,进样口温度:280℃,离子源温度:200℃,溶剂延迟时间:6.0 min,溶剂切割时间:6.5 min,质谱扫描范围:35~550 m/z。程序升温条件:柱温70℃保持4 min,20℃/min速率升温至110℃,8℃/min速率升温至270℃,保持5 min。

2.1.6 数据分析 所有样本经GC-MS检测后,得总离子流色谱图,对采集得到的谱图进行峰识别、峰对齐、峰匹配和峰强度校正等操作,其中峰识别通过NIST数据库进行鉴定和注释(鉴定结果入选要求需满足峰相似度大于80%),将结果整理成Excel表格,包含鉴定化合物保留时间和相对内标峰面积,导入SMICA-14.0统计软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析

(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal Partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),根据VIP值大于1筛选差异代谢物。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据采用SPSS 21.0统计软件进行t检验,显著性水平设为 $P<0.05$ 。采用MetaboAnalyst([www.metabo-analyst.ca](http://www.metabo-analyst.ca))数据分析平台进行代谢通路分析。

## 2.2 网络药理学预测

2.2.1 成分相关靶点预测 根据前期研究得到的夏枯草茎叶酚酸类成分<sup>[5]</sup>,通过PubChem数据库<sup>[9]</sup>(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)查询SMILES号,上传SMILES号于SwissTarget Prediction数据库<sup>[10]</sup>(<http://www.swisstargetprediction.ch>),设置属性为“Homo sapiens”,获取靶点信息。

2.2.2 炎症相关靶点筛选及共同靶点 采用“chronic pelvic inflammatory disease”作为关键词,检索GeneCards数据库<sup>[11]</sup>(<https://www.genecards.org/>)得到慢性盆腔炎相关靶点。导入Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),取成分和炎症对应靶点的交集,得共同靶点。

2.2.3 PPI网络构建 将上述得到的共同靶点上传至STRING v12.0<sup>[12]</sup>(<https://version-12-0.string-db.org/>)数据库,选择“Homo sapiens”物种,靶点关联的置信度为0.40,获取PPI网络图,并通过Cytoscape 3.9.1软件<sup>[13]</sup>分析,利用cytoHubba插件中的MCC算法识别PPI网络的hub基因。

2.2.4 核心靶标的GO功能及KEGG通路富集分析 将共同靶点导入Metascape数据库<sup>[14]</sup>([\[cape.org/\]\(http://cape.org/\)\)进行GO功能和KEGG通路富集分析,设置“Homo sapiens”为物种,然后利用微生信平台\(<http://www.bioinformatics.com.cn/>\)进行可视化分析。](https://metas-</a></p></div><div data-bbox=)

2.2.5 分子对接 采用Discovery Studio 2019软件<sup>[15]</sup>进行分子对接,对接配体和受体分别从PubChem数据库和PDB数据库<sup>[16]</sup>(<https://www.rcsb.org/>)中获得。以CDOCKER Energy作为标准评估分子对接结果,选取最高C-Docker能量评分值的构象用于可视化分析。

## 3 结果

### 3.1 GC-MS图谱与代谢物质指认

血清样本上机检测,经过自动质谱去卷积鉴定系统对TIC谱图(图1)进行噪声处理、基线校正,对其中相似度大于80%的化合物进行鉴别和分析,共鉴定47个化合物,主要为糖类、氨基酸、有机酸、脂肪酸、多元醇等内源性物质。

### 3.2 组间差异代谢物的筛选和分析

PCA可在多维空间对样本间差异进行直观显示,如图2A所示,6个QC样本集中在原点附近,表明模型拟合稳定;正常组和模型组样本居于两侧,表明两者之间存在明显差异;正常组和假手术组样本均居于第四象限,说明本次实验手术不影响代谢物的变化;药物组居于正常组和模型组之间,并趋于正常组,说明经过夏枯草治疗后,大鼠体内代谢物差异向正常转移。PLS-DA构建提供多组别数学模型,在PLS-DA模型中( $R_2Y=0.77$ ,  $Q_2=0.56$ ,数值大于0.5说

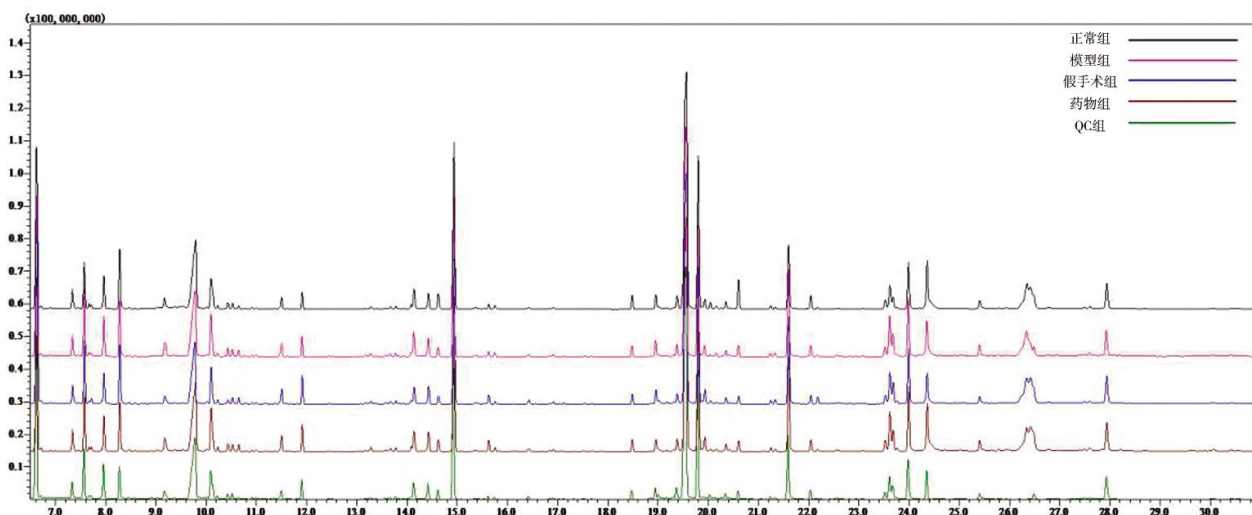


图1 样本总离子流色谱图

明模型具有较好的预测度和拟合度,如图 2B 所示),正常组、模型组、假手术组、药物组、QC 组组间和组内差异更为清晰(图 2C)。

为进一步明确正常组和模型组之间的代谢物差异,构建两组间 OPLS-DA 模型( $R_2Y=0.98, Q_2=0.92$ ,数值大于 0.5 说明模型具有较好的预测度和拟合度,如图 2D 所示),正常组和模型组居于 OPLS-DA 模型两侧(如图 2E 所示),模型准确度采用 20 个置换的置换检验( $R_2=0.811$  和  $Q_2=-0.325$ ,说明模型可靠,如图 2F 所示)。

OPLS-DA 通过消除组间误差和随机误差,提高模型对数据的解析能力,其中,  $VIP>1$  且  $P<0.05$  的变量与慢性盆腔炎有潜在关联(如图 2G 和表 1 所示)。分析正常组和模型组大鼠差异代谢物可知,相比于正常组,慢性盆腔炎大鼠血清中尿素显著降低,葡萄糖糖酸、L-赖氨酸、D-葡萄糖醛酸、甘油、甘氨酸、L-丝氨酸、花生四烯酸、2-单棕榈酸甘油、棕榈酸、L-苏氨酸、1,5-无水葡萄糖、L-异亮氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸显著升高,经夏枯草茎叶酚酸给药后,尿素、葡萄糖糖酸、L-赖氨酸、D-葡萄糖醛酸、甘氨酸、L-丝

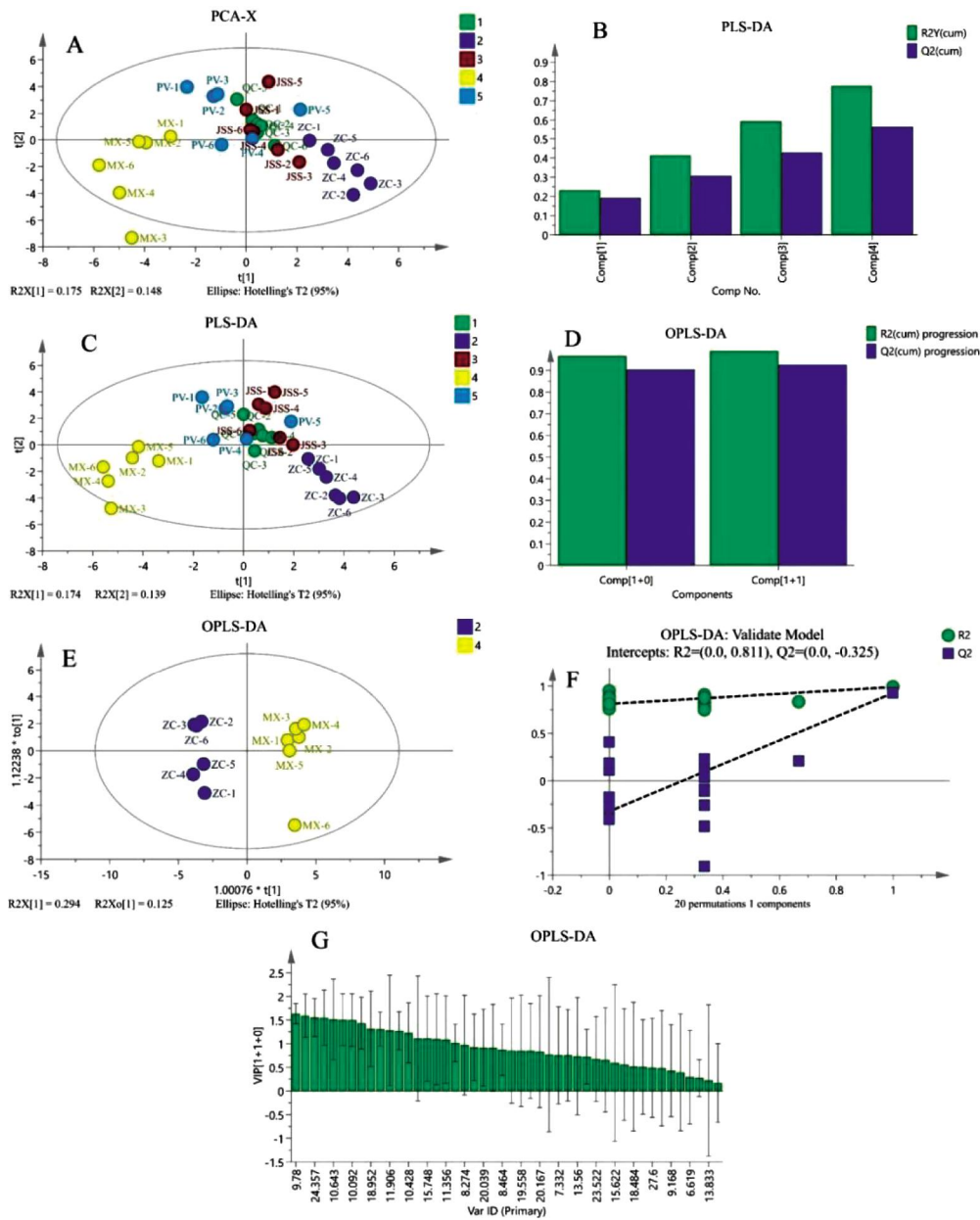


图 2 差异代谢物的 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 分析图

注:A 为组间 PCA 散点图;B 为 PLS-DA 拟合图;C 为 PLS-DA 散点图;D 为 OPLS-DA 拟合图;E 为 OPLS-DA 散点图;F 为 OPLS-DA 模型验证图;G 为 OPLS-DA 模型 VIP 图。A、C、E 散点图中 QC 为样本;ZC 为正常组;JSS 为假手术组;MX 为模型组;PV 为药物组。



表 1 差异代谢物信息

保留时间/min	英文名称	中文名称	相对峰面积			VIP 值	P 值(正常组-模型组)	P 值(模型组-药物组)
			正常组	模型组	药物组			
9.78	urea	尿素	1.180±0.090	0.660±0.020	0.810±0.08	1.63	<0.010	<0.010
20.42	D-gluconic acid	葡萄糖酸	0.011±0.001	0.015±0.001	0.013±0.001	1.59	<0.010	<0.010
24.36	D-gluconic acid	D-葡萄糖醛酸	0.330±0.030	0.470±0.030	0.380±0.020	1.55	<0.010	<0.010
19.02	L-lysine	L-赖氨酸	0.020±0.003	0.056±0.010	0.035±0.010	1.54	<0.010	0.040
10.64	glycine	甘氨酸	0.021±0.007	0.048±0.009	0.034±0.003	1.51	<0.010	<0.010
11.49	serine	L-丝氨酸	0.063±0.007	0.093±0.009	0.074±0.010	1.50	<0.010	0.020
10.09	glycerol	甘油	0.240±0.030	0.340±0.040	0.310±0.040	1.50	<0.010	0.40
25.40	arachidonic acid	花生四烯酸	0.066±0.010	0.110±0.010	0.089±0.010	1.43	<0.010	0.040
18.95	1,5-anhydroglucitol	1,5-无水葡萄糖醇	0.060±0.010	0.090±0.010	0.090±0.020	1.31	<0.010	0.80
27.49	2-palmitoylglycerol	2-单棕榈酸甘油	0.007±0.001	0.009±0.001	0.009±0.001	1.30	<0.010	0.40
11.90	L-threonine	L-苏氨酸	0.110±0.010	0.140±0.020	0.120±0.010	1.28	<0.010	0.020
21.59	palmitic acid	棕榈酸	0.440±0.040	0.530±0.050	0.570±0.050	1.27	0.017	0.20
10.42	L-isoleucine	L-异亮氨酸	0.036±0.002	0.044±0.005	0.039±0.003	1.23	0.013	0.080
10.51	L-proline	L-脯氨酸	0.037±0.004	0.045±0.006	0.036±0.003	1.11	0.039	0.020
15.74	L-phenylalanine	L-苯丙氨酸	0.016±0.006	0.023±0.002	0.020±0.005	1.10	0.030	<0.010

氨酸、花生四烯酸、L-苏氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸等差异代谢物向正常方向转移。

### 3.3 血清差异代谢物的代谢通路分析

将差异代谢物导入至 MetaboAnalyst 4.0 数据库中,进行代谢通路富集分析,将 Pathway Impact>0.2 的代谢途径作为最重要的代谢途径,其中有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,抗坏血酸和醛糖二酸代谢,苯丙氨酸代谢,花生四烯酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。详见图 3。

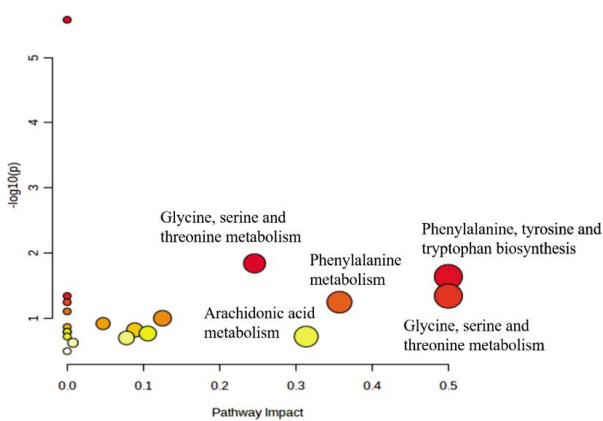


图 3 特异性标记物的代谢通路分析

### 3.4 网络药理学

3.4.1 成分和疾病靶点的筛选与共同靶点 在 Swiss TargetPrediction 数据库中,鉴定的 22 个化学成分,删除重复靶点后得 542 个靶点。从 GeneCards 数据库去重后得 5 877 个盆腔炎相关靶点。将成分和疾病靶点在 Venny 2.1 上取交集,得 320 个共同靶点,见图 4。

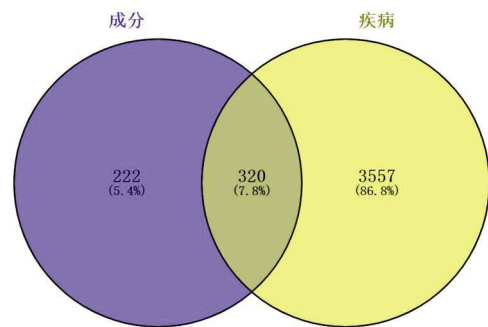


图 4 夏枯草目标化学成分与盆腔炎相关靶点的韦恩图

3.4.2 PPI 网络构建及核心靶点筛选 将药物和疾病交集靶点上传至 STRING 12.0 数据库,导出 TSV 文件,通过 Cytoscape3.9.1 软件的 cytoHubba 插件的 MCC 算法识别 PPI 网络的 hub 基因,取前 20 个作为核心靶点进行展示。详见图 5。

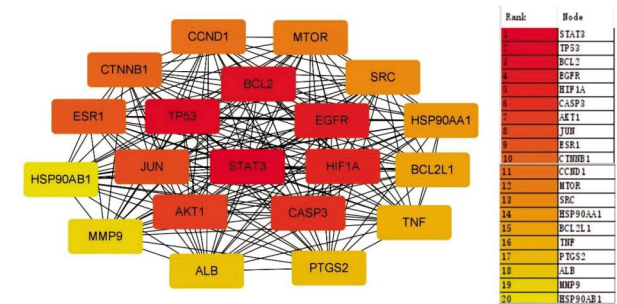


图 5 PPI 网络图

3.4.3 核心靶标的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 将上述得到的核心靶点在 Metascape 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 P<0.01 为筛选条件得到

GO 分析结果中生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF) 相关条目分别为2 724、160、332 个。以 $-\lg P$  值来衡量 GO 富集程度,取前 10 位进行可视化展示,见图 6。GO 功能分析表明,对激素的反应(response to hormone)、细胞对氮化合物的反应(cellular response to nitrogen compound)和磷酸化的正向调节(positive regulation of phosphorylation)等是主要参与的 BP;膜筏(membrane raft)、膜微区(membrane microdomain)和细胞体(cell body)等为主要 CC;MF 主要与蛋白激酶活性(protein kinase activity)、以醇为受体的磷酸转移酶活性(phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor)以及激酶活性(kinase activity)等相关。通路分析得到 217 条 KEGG 富集条目,以 $-\lg(P)$ 值为条件,前20 条通路见图 7。KEGG 通路富集结果显示,PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、甲状腺激素信号通路(Thyroid hormone signaling pathway)和内分泌抵抗(Endocrine resistance)等为主要富集的通路。

3.4.4 分子对接 对接靶蛋白的 PDB ID 分别为 EGFR(3G5X)/SRC(1KC2)/STAT3(6GFA)信号通路和 BCL2(5UUK)/AKT1(3OS5)信号通路。结合能热图见图 8。EGFR/SRC/STAT3 信号通路评分较高,因

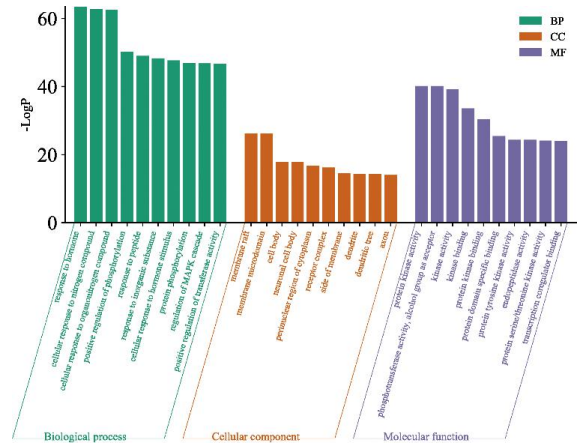


图 6 GO 富集分析

此,选用最高 C-Docker 能量评分的构象进行可视化分析,结果见图 9。

3.4.5 “成分-靶点-差异代谢产物”网络 利用 Cytoscape 3.10.0 软件构建“成分-靶点-差异代谢产物”关系网络并进行可视化分析,见图 10。其中,按度值(degree)排序,夏枯草核心成分由大到小依次是:白射干素(dichotomitin)、3-羟基肉桂酸(m-coumaric acid)、咖啡酸(caffeic acid)、原儿茶醛(protocatechualdehyde)、迷迭香酸(rosmarinic acid)、2,5-二羟基苯甲醛(2,5-dihydroxybenzaldehyde)、秦皮素(fraxetin)、对羟基苯乙酮(4-hydroxyacetophenone)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(nicotiflorin)、异槲皮苷(iso-quercitrin)。差异代谢物影响由大到小依次是:甘氨酸(glycine)、甘油(glyc-

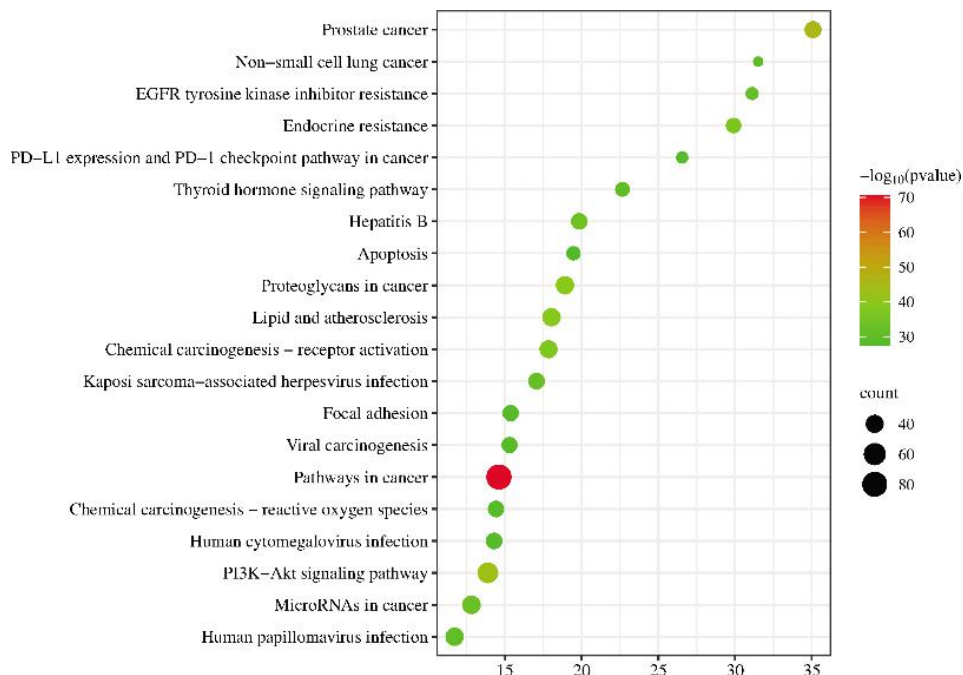


图 7 KEGG 富集分析气泡图

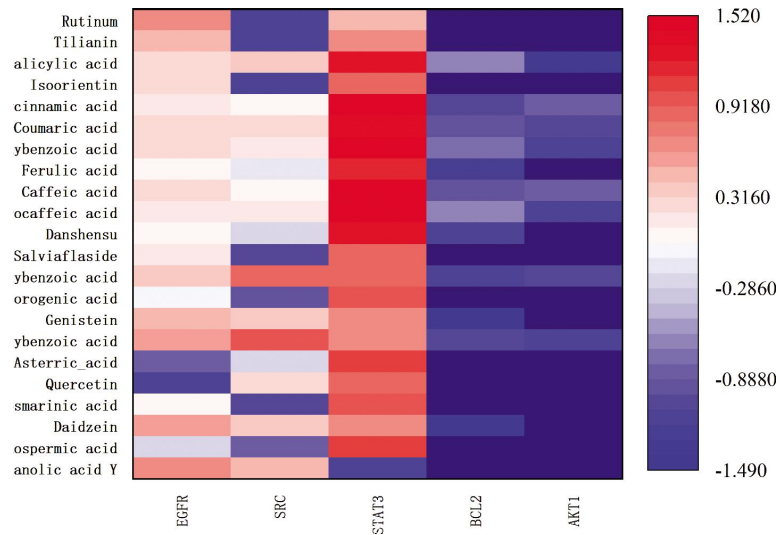


图8 分子对接热图分析

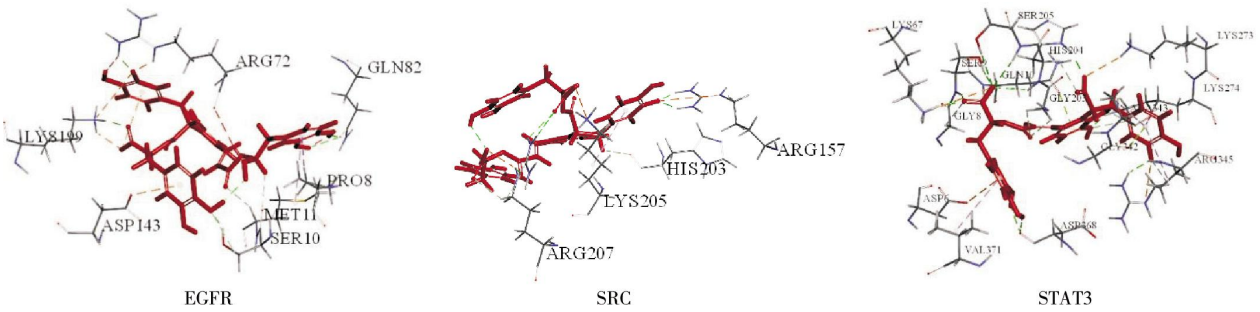


图9 分子对接可视化图

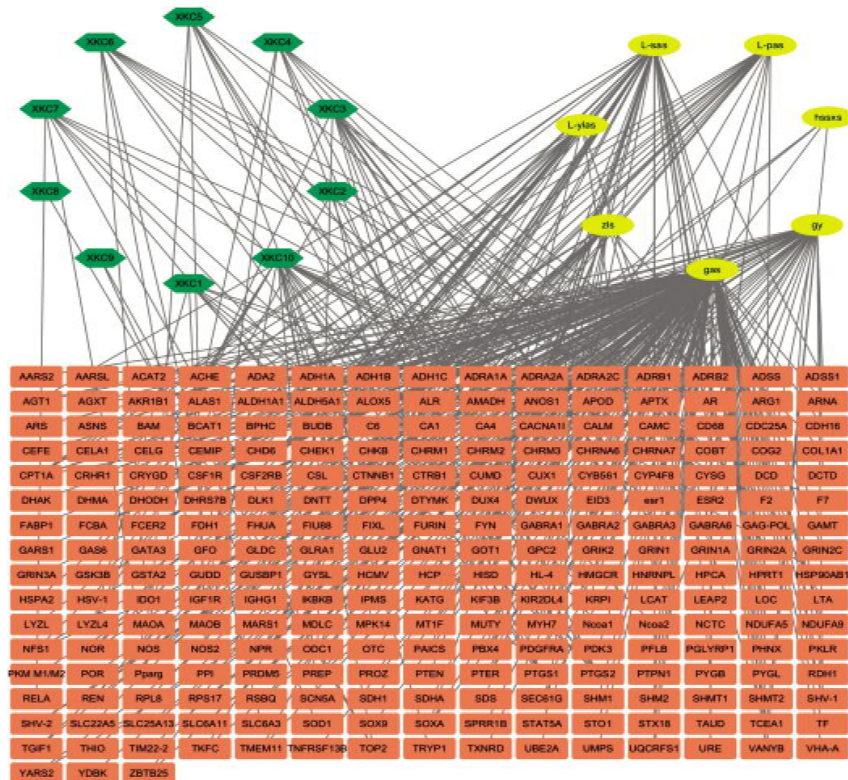


图10 “成分-靶点-差异代谢物”网络

注: xkc1 为 2,5-dihydroxybenzaldehyde; xkc2 为 4-hydroxyacetophenone; xkc3 为 protocatechualdehyde; xkc4 为 caffeic acid; xkc5 为 fraxetin; xkc6 为 m-coumaric acid; xkc7 为 rosmarinic acid; xkc8 为 iso-quercitrin; xkc9 为 nicotiflorin; xkc10 为 dichotomitin; gas 为 glycine; L-sas 为 L-serine; gy 为 glycerol; hssxs 为 arachidonic acid; zls 为 palmitic acid; L-ylas 为 L-isoleucine; L-pas 为 L-prolinum。



erol)、*L*-丝氨酸(*L*-serine)、*L*-脯氨酸(*L*-prolinum)、棕榈酸(palmitic acid)、*L*-异亮氨酸(*L*-isoleucine)、花生四烯酸(arachidonic acid)。成分和和差异代谢物影响的核心靶点分别有:COBT、ADH1C、MAOB、PTGS2、PTGS1、LYZL4、ADH1B、MAOA、NOS2。通过图10可知,夏枯草的治疗慢性盆腔炎具有多成分、多靶点的作用特点。

#### 4 讨论

当前,随着中医药事业的发展壮大,中药材供不应求,资源短缺日益加剧,中药非药用部位开发成为研究的热点,如怀山药根茎的皮和叶片中含有丰富的黄酮类化合物,具有较大开发潜力<sup>[17-18]</sup>。课题组前期实验表明,慢性盆腔炎大鼠模型经夏枯草茎叶酚酸干预后,子宫组织充血水肿、粘连及炎性细胞浸润、上皮细胞坏死脱落等病理形态得到修复,炎症反应缓解<sup>[9]</sup>。本研究基于GC-MS技术的代谢组学研究慢性盆腔炎模型大鼠生物体内代谢物的生理变化,并阐述其与疾病的关联性,发现慢性盆腔炎大鼠造模前后血清中氨基酸、有机酸等发生明显变化,给予夏枯草茎叶酚酸干预后,可扭转部分差异代谢物变化趋势,如尿素、葡萄糖酸、*D*-葡萄糖醛酸、*L*-赖氨酸、甘氨酸、*L*-丝氨酸、*L*-苏氨酸、*L*-脯氨酸、*L*-苯丙氨酸等代谢物。富集分析结果表明,慢性盆腔炎影响了苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,抗坏血酸和醛糖二酸代谢,苯丙氨酸代谢,花生四烯酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等代谢途径。

目前,将氨基酸作为炎症指标受到较多的关注。研究人员在炎症患者体内发现血清中丙苯氨酸的积累与新蝶呤或可溶性肿瘤坏死因子受体等免疫活性标记物呈相关性,当炎症存在时,苯丙氨酸以及酪氨酸和苯丙氨酸比值均升高,为急性缺血性卒中、冠心病等心血管疾病提供新的诊断思路<sup>[20-21]</sup>。丝氨酸和苏氨酸是蛋白质、核酸和脂质的前体,作为糖酵解的分支,通过转换成甘氨酸参与碳代谢,为鞘磷脂和磷脂的合成提供头基,参与肿瘤过程线粒体一碳途径<sup>[22-23]</sup>。在免疫细胞中,机体炎症因子激活丝氨酸/苏氨酸激酶-24,抑制IL-17诱导的NF- $\kappa$ B磷酸化,降低IL-17诱导的趋化因子和细胞因子的表达,是IL-17介导的信号和炎症的正向调节器<sup>[24]</sup>。研究

也表明,随着炎症的加剧,参与免疫细胞调节反应的mTOR途径和GCN-2途径也与丝氨酸/苏氨酸激酶密切相关<sup>[25]</sup>。炎症的加剧促进了丝氨酸和苏氨酸代谢,含量升高。课题组前期结果表明,盆腔炎大鼠子宫内膜厚度增加、输卵管堵塞和粘连、炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著升高,在盆腔炎大鼠中观察到苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸的升高表明炎症的加剧,给予夏枯草茎叶酚酸治疗后,苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸下降,炎症反应减轻<sup>[26]</sup>。

抗坏血酸作为一种氧化剂,通过免疫调节和氧化应激反应缓解炎症有较多报道,如减轻氧化锌纳米颗粒引起的肺急性炎症<sup>[27]</sup>,缓解硫酸右旋糖酐所致小鼠溃疡性结肠炎的氧化应激<sup>[28]</sup>,抑制白细胞中髓过氧化物酶-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-卤化物系统的活化<sup>[29]</sup>。*D*-葡萄糖醛酸是抗坏血酸合成途径的前体物质,参与抗坏血酸和醛糖二酸代谢途径。在本研究中,经过混合菌液感染后,机体免疫应激反应激活,促进了抗坏血酸的合成和释放,*D*-葡萄糖醛酸含量相比于正常组明显增加。经过夏枯草茎叶酚酸干预后,炎性介质及免疫应激反应有所改善,*D*-葡萄糖醛酸含量降低。

综上所述,本研究基于GC-MS技术探究夏枯草茎叶水提取物对慢性盆腔炎大鼠血清代谢变化的影响,发现模型大鼠经混合菌液感染后,机体免疫反应激活,促进了抗坏血酸的合成和释放,刺激炎症反应。经过夏枯草茎叶酚酸干预后,炎症反应缓解,其机制可能与作用于COBT、ADH1C、MAOB等靶点,干预PI3K-Akt信号通路、甲状腺激素信号通路和内分泌抵抗等信号通路,引起差异代谢物变化有关。本研究的完成,证明了夏枯草茎叶的药用价值,可为实现中药非药用部位的开发研究提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] BAI Y B, XIA B H, XIE W J, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella*[J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 483-496.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 197.
- [3] 严东, 谢嘉驰, 周亚敏, 等. 基于液质联用技术及抗炎与抗氧化活性研究夏枯草茎叶和果穗的替代性[J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(10): 792-797.
- [4] 罗弘杉, 谭知浩, 徐春芳, 等. 夏枯草茎叶总酚酸提取工艺优化

- 及其化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(5): 700–706.
- [5] 谭知浩, 肖志葵, 罗弘杉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学探讨夏枯草茎叶抗炎有效成分及其作用机制[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 795–804.
- [6] 李翠萍, 马文侠. 盆腔炎治疗慢性盆腔炎的临床研究[J]. 中成药, 1999, 21(4): 185–186.
- [7] 周亚敏, 肖榕, 胡玉珍, 等. 玉竹多糖对甲亢阴虚型大鼠干预的血清代谢组学研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(14): 1263–1268.
- [8] 邓静, 林丽美, 张鹏, 等. 基于 GC-MS 的妇科千金胶囊挥发油治疗盆腔炎大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12): 1462–1469.
- [9] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D1388–D1395.
- [10] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Web Server issue): W32–W38.
- [11] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1–1.30.33.
- [12] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein–protein networks, and functional characterization of user–uploaded gene/measurement sets[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D605–D612.
- [13] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498–2504.
- [14] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist–oriented resource for the analysis of systems–level datasets[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1523.
- [15] 黄勇, 陈晨, 张志毅, 等. Autodock Vina 与 Discovery Studio 在虚拟筛选耐药蛋白抑制剂中的比较[J]. 生物信息学, 2012, 10(4): 248–253.
- [16] DESAPHY J, BRET G, ROGNAN D, et al. Sc-PDB: A 3D–database of ligandable binding sites: 10 years on[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue): D399–D404.
- [17] 赵晖, 苗明三. 中药非药用部位综合利用的分析与思考[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3589–3591.
- [18] 吕鹏, 贾秀梅, 张振凌, 等. 怀山药及非药用部位总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 65–68.
- [19] 肖志葵, 谭知浩, 罗弘杉, 等. 基于转录组学探讨夏枯草茎叶总多酚对慢性盆腔炎大鼠的药效学作用及机制[J]. 特产研究, 2023, 45(2): 81–89.
- [20] ORMSTAD H, VERKERK R, SANDVIK L. Serum phenylalanine, tyrosine, and their ratio in acute ischemic stroke: On the trail of a biomarker? [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2016, 58(1): 102–108.
- [21] MURR C, GRAMMER T B, MEINITZER A, et al. Immune activation and inflammation in patients with cardiovascular disease are associated with higher phenylalanine to tyrosine ratios: The ludwigshafen risk and cardiovascular health study[J]. Journal of Amino Acids, 2014, 2014: 783730.
- [22] WU X L, LIU C, YANG S, et al. Glycine–serine–threonine metabolic axis delays intervertebral disc degeneration through antioxidant effects: An imaging and metabolomics study[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 5579736.
- [23] LI A M, YE J B. Reprogramming of serine, glycine and one–carbon metabolism in cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease, 2020, 1866(10): 165841.
- [24] JIANG Y, TIAN M, LIN W L, et al. Protein kinase serine/threonine kinase 24 positively regulates interleukin 17–induced inflammation by promoting IKK complex activation[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 921.
- [25] MCGAHA T L, HUANG L, LEMOS H, et al. Amino acid catabolism: A pivotal regulator of innate and adaptive immunity[J]. Immunological Reviews, 2012, 249(1): 135–157.
- [26] 李亚梅, 张凯强, 彭壮, 等. 大叶千斤拔对慢性盆腔炎大鼠的抗炎作用及机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(11): 874–880.
- [27] FUKUI H, IWAHASHI H, ENDOH S, et al. Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles[J]. Journal of Occupational Health, 2015, 57(2): 118–125.
- [28] YAN H Y, WANG H J, ZHANG X L, et al. Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium–induced ulcerative colitis in mice[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8(11): 20245–20253.
- [29] YARA S, LAVOIE J C, BEAULIEU J F, et al. Iron–ascorbate–mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: Impact on inflammation[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63456.