

本文引用:张娟娟,张曦,杨逸璇,康慰,谢小丽,朱明芳.加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏对湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型脂质组学的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(10): 1641-1649.

## 加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏对湿热痰瘀型 金黄地鼠痤疮模型脂质组学的影响

张娟娟<sup>1,2</sup>,张曦<sup>1</sup>,杨逸璇<sup>1</sup>,康慰<sup>2</sup>,谢小丽<sup>1</sup>,朱明芳<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005;2.浏阳市中医医院,湖南浏阳 410300)

**〔摘要〕** **目的** 探讨加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏对湿热痰瘀型痤疮动物模型金黄地鼠皮脂腺斑的作用机制。**方法** 将金黄地鼠随机分为模型组、中药外治组、中药内服组、中药内外合治组,每组8只。采用复合因素(外部湿热环境+肥甘饮食+限制动物活动空间)构建湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型。除模型组外,其余各组分别给予石榴皮多酚乳膏外用(于两侧皮脂腺斑处(每侧1 mL/次)、加味三仁汤灌胃(680 mg·kg<sup>-1</sup>)、加味三仁汤灌胃联合石榴皮多酚乳膏外用(方法、给药量与外治组、内服组相同),2次/d,连续给药14 d。通过观察金黄地鼠一般状况、皮脂腺斑总面积及组织病理变化评价加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏对金黄地鼠痤疮模型的干预作用;采用液相色谱-串联质谱联用技术,结合多元统计分析方法,对金黄地鼠皮脂腺斑进行非靶向脂质组学分析,探讨二者内外合治干预湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型的作用机制。**结果** 加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏可以改善金黄地鼠痤疮模型一般状况、抗皮脂腺斑增生和组织病理损伤。在两组对比所得的共同差异代谢物中,共鉴定出13个与金黄地鼠皮脂腺斑脂质代谢相关的潜在生物学标志物。代谢通路分析显示差异脂质分子与亚油酸代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢相关。**结论** 加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏内外合治与模型组之间存在明显的脂质含量差异,这些差异表达的脂质分子可能是二者内外合治对湿热痰瘀型痤疮模型的干预靶点,二者内外合治对湿热痰瘀型痤疮的治疗作用机制可能与调节脂肪酸类代谢通路、甘油酯类代谢通路有关。

**〔关键词〕** 痤疮;加味三仁汤;石榴皮多酚乳膏;湿热痰瘀;金黄地鼠;液相色谱-串联质谱联用技术

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.009

### Effects of combining Modified Sanren Decoction and Pomegranate Peel Polyphenol Cream on lipidomics of golden hamsters acne model of damp-heat and phlegm-stasis type

ZHANG Juanjuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xi<sup>1</sup>, YANG Yixuan<sup>1</sup>, KANG Wei<sup>2</sup>, XIE Xiaoli<sup>1</sup>, ZHU Mingfang<sup>1\*</sup>

(1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang, Hunan 410300, China)

**〔Abstract〕** **Objective** To investigate the mechanism of Modified Sanren Decoction combined with Pomegranate Peel Polyphenol Cream on the sebaceous spots of golden hamsters acne model of damp-heat and phlegm-stasis type. **Methods** Golden hamsters were randomly divided into model group, external treatment group with Chinese medicine, internal administration group with Chinese medicine, internal and external treatment group with Chinese medicine, with 8 hamsters in each group. A model of golden hamsters acne of damp-heat and phlegm-stasis type was constructed by compound factors (damp-heat external environment + fatty and sweet diet + restricted animal activity space). External treatment group with Chinese medicine was given Pomegranate Peel

**〔收稿日期〕** 2022-04-19

**〔基金项目〕** 国家自然科学基金项目(82174375);湖南省中医药科研计划项目(2021093);湖南省临床医疗技术创新引导项目(2020SK51501);湖南省卫生健康委科研项目(202202124772);湖南省中医药科研计划项目(C2022026);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目。

**〔第一作者〕** 张娟娟,女,博士研究生,研究方向:皮肤病的中西医结合防治。

**〔通信作者〕** \* 朱明芳,女,教授,博士研究生导师,E-mail:26715858@qq.com。

Polyphenols Cream for both sides of the sebaceous gland spots (1 mL per side each time); internal administration group with Chinese medicine received Modified Sanren Decoction by intragastric administration (680 mg/kg); internal and external treatment group with Chinese medicine was given Modified Sanren Decoction by intragastric administration and Pomegranate Peel Polyphenols Cream for both sides of the sebaceous gland spots (the method and dosage were the same as those of external treatment group with Chinese medicine and internal administration group with Chinese medicine). All interventions were twice a day for 14 d. The intervention effects of combining internal and external treatment on the acne model of golden hamsters were evaluated by observing the general condition, the total area of sebaceous gland spots and histopathological changes of golden hamsters; the non-targeted lipidomic analysis of sebaceous gland spots was carried out using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technology combined with multivariate statistical analysis methods. The mechanism of the combined internal and external treatment with Chinese medicine in treating acne model of damp-heat and phlegm-stasis type was discussed. **Results** Modified Sanren Decoction combined with Pomegranate Peel Polyphenol Cream may improve general conditions of the golden hamsters model, inhibit hyperplasia of the sebaceous gland spots and histopathological damage. In the common differential metabolites obtained from the comparison of the two sets, we identified a total of 13 potential biological markers associated with lipid metabolism in the sebaceous gland spots of golden hamsters. Metabolic pathway analysis showed that differential lipid molecules were associated with the metabolisms of linoleic acid, glycerolipid, arachidonic acid, and  $\alpha$ -linolenic acid. **Conclusion** There were significant differences in lipid content between internal and external treatment group with Chinese medicine and model group. The lipid molecules with differential expressions may be the intervention targets of the combining internal and external treatments for the acne models of damp-heat and phlegm-stasis type; the mechanism of the combining internal and external treatment for acne of damp-heat and phlegm-stasis type may be related to the regulation of fatty acid metabolism pathway and glyceride metabolic pathway.

[**Keywords**] acne; Modified Sanren Decoction; Pomegranate Peel Polyphenol Cream; damp-heat and phlegm-stasis; golden hamsters; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

痤疮是一种毛囊皮脂腺单位的慢性炎症性皮肤病,好发于年轻人群颜面、胸背等皮脂腺分布丰富的部位。皮脂生成增多,皮脂成分改变等皮脂腺稳态的改变与痤疮的发病密切相关<sup>[1]</sup>。MENLIK 提出痤疮是一种发生于皮脂腺毛囊的代谢综合征<sup>[2]</sup>。饮食诱导的脂质代谢改变可促进皮脂腺炎症反应的发生,进而诱导加重痤疮的发生<sup>[3]</sup>。研究显示,痤疮患者的主要体质类型为湿热质<sup>[4]</sup>。湿热体质者,素体阳热旺盛,过食肥甘厚味、辛辣炙煨之品,致湿热内蕴,循经上蒸于颜面;脾胃内伤,失于健运,湿浊内生,郁久化热,炼津成痰,加上久坐少动、忧思烦劳过重,易致气机郁滞不畅,肝之疏泄失调,日久气郁生瘀,湿热痰瘀凝滞肌肤而发痤疮。诸因或独或合,易成脾胃湿热、痰瘀阻络证<sup>[5]</sup>。

三仁汤始载于清代吴鞠通《温病条辨·上焦·湿温》,由杏仁、飞滑石、白通草、白蔻仁、淡竹叶、厚朴、生薏苡仁、半夏 8 味药组成<sup>[6]</sup>。全方化湿于宣畅气机之中,清热于渗利湿浊之间,三焦兼顾,偏重中焦,治则正合痤疮中焦脾胃湿热的病因病机。三仁汤组方侧重于祛湿之功,化痰之力稍逊,痰和湿属于一类,故加味三仁汤在此基础上加一味海藻,取其咸能软

坚、消痰散结兼利水,与方中利湿药同用,进一步强化痰、除湿的作用;三仁汤用药多在气分,加一味郁金引入血分,可活血化瘀、疏肝、降脂<sup>[7]</sup>。本课题组前期临床观察发现,加味三仁汤内服行宣气化湿、化痰化瘀之功,可有效改善湿热痰瘀型痤疮患者面部油脂分泌过多的症状。实验研究表明石榴皮多酚对金黄地鼠皮脂腺斑的作用机制可能与其抑制皮脂腺脂质合成、抑制炎症反应有关<sup>[8-9]</sup>。然而,加味三仁汤与石榴皮多酚乳膏二者合用对湿热痰瘀型痤疮皮脂脂质代谢的作用机制尚不清楚。

因此,本研究采用非靶向脂质代谢组学技术,研究湿热环境+肥甘饮食+限制动物活动空间的复合因素下内服加味三仁汤联合外用石榴皮多酚乳膏干预金黄地鼠后,其皮脂腺斑脂质代谢物含量的变化及对代谢通路的影响,为运用中药内外合治治疗湿热痰瘀型痤疮提供新的研究思路和理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级健康雄性金黄地鼠,体质量 110~130 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2021-0011。每只分笼圈养于湖南普

瑞玛药物研究中心有限公司动物实验室,许可证号:SYXXK(湘)2020-0015。自然饲养环境:全价营养颗粒饲料饲养,自由饮水活动,12 h光照及12 h黑夜,饲养温度( $22\pm 2$ )℃,湿度59%~65%。本研究经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理委员会审查批准[审批号:IACUC-2021(5)037]。

## 1.2 药品

加味三仁汤药材选用中药颗粒剂,由浏阳市中医医院智能中药房提供(四川新绿色药业科技发展有限公司生产。姜半夏批号20090183,浓缩比1:21,1 g配方颗粒相当于饮片21 g;煨苦杏仁批号20090015,浓缩比1:12.5,1 g配方颗粒相当于饮片12.5 g;生薏苡仁批号20100043,浓缩比1:15,1 g配方颗粒相当于饮片15 g;滑石批号20090168,浓缩比1:11,1 g配方颗粒相当于饮片11 g;豆蔻批号21010128,浓缩比1:21,1 g配方颗粒相当于饮片21 g;姜厚朴批号20110128,浓缩比1:21,1 g配方颗粒相当于饮片21 g;小通草批号20080027,浓缩比1:11,1 g配方颗粒相当于饮片11 g;淡竹叶批号20050118,浓缩比1:11,1 g配方颗粒相当于饮片11 g;海藻批号20050079,浓缩比1:21,1 g配方颗粒相当于饮片21 g;郁金批号20030179,浓缩比1:17,1 g配方颗粒相当于饮片17 g)。石榴皮多酚乳膏由课题组参考前期研究临方配制<sup>[10]</sup>。

## 1.3 主要仪器与试剂

1.3.1 仪器 超高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:Ultimate 3000);高分辨质谱仪(美国ABSCIEX公司,型号:TripleTOF 5600);离心机(美国赛默飞世尔科技公司,型号:Heraeus Frescol17);纯水仪(默克密理博公司,型号:明澈D24UV);色谱柱(Waters科技有限公司,型号:ACQUITY UPLC)。

1.3.2 试剂 甲醇、乙腈、甲酸(美国霍尼韦尔Burdick&Jackson公司),有机溶剂均为分析纯、色谱级。60%石榴皮多酚(西安悦然生物科技有限公司,批号:20210916);水包油型乳膏基质(郑州市津北化工有限公司);高糖高脂饲料(80%全价营养颗粒饲料+12%猪油+8%蜂蜜)由湖南普瑞玛药物研究中心有限公司提供。

## 2 方法

### 2.1 药物的制备

加味三仁汤药物组成:三仁汤加海藻、郁金。三仁汤药物组成参照《温病条辨》原组成比例,姜半夏、

煨苦杏仁各15 g,生薏苡仁、滑石各18 g,豆蔻、姜厚朴、小通草、淡竹叶各6 g,加海藻15 g,郁金12 g。1剂中药配方颗粒的重量为759 mg(60 kg体质量成人的每日用量),参考《人类疾病动物模型》<sup>[11]</sup>中动物模型药物剂量的换算方法,确定金黄地鼠日给药量 $680\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。每次使用前将其用蒸馏水温水配制成混悬液。

石榴皮多酚乳膏:参考课题组前期研究结果<sup>[10]</sup>,配成10%石榴皮多酚乳膏[0.32 g生药/(kg·d),通过体表面积换算<sup>[12]</sup>,相当于等效剂量的2倍]。将棕红色的石榴皮多酚粉末溶于少量水中,再加入至水包油型乳膏基质中,配成10%的浓度。每天上午配制1次,供当日上午和下午使用,10 h内用完。

### 2.2 湿热瘀痹型金黄地鼠痤疮动物模型的建立

以国内外公认的可作为研究药物抗皮脂腺增生活性的金黄地鼠两侧侧腹部皮脂腺斑为痤疮动物模型<sup>[13]</sup>,通过复合因素(外部湿热环境+肥甘饮食+限制动物活动空间)模拟痤疮患者进食肥甘厚味、久坐少动等不良的生活方式,构建湿热瘀痹型痤疮动物模型<sup>[14-15]</sup>。具体方法如下:动物适应性饲养5 d后开始造模,造模前禁食12 h,自由饮水活动。肥甘饮食饲料喂养10 d,每天上午9:00至11:00将动物置于仿真模拟气候仓[环境设置为:温度( $33\pm 2$ )℃,相对湿度70%~80%],共18 d,整个造模期间每天下午1:00至6:00限制金黄地鼠活动空间(模拟少动)。第19天上午9:00移出置于自然饲养环境。经上述造模干预,金黄地鼠毛发湿润杂乱,小便量偏多色黄,异味明显,大便溏或质稠,垫料馊臭。另外,通过金黄地鼠目内眦取血并进行检测,与正常饲养的金黄地鼠比较,结果显示造模金黄地鼠低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)、胆固醇(cholesterol, CHO)指标上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)指标变化不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示造模成功。详见表1。

表1 两组动物LDL-C、TG、CHO、HDL-C比较(mmol/L,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | n | LDL-C      | TG         | CHO        | HDL-C     |
|-------|---|------------|------------|------------|-----------|
| 正常对照组 | 5 | 0.94±0.11  | 1.92±0.47  | 3.94±0.39  | 2.51±0.34 |
| 造模组   | 5 | 2.31±0.49* | 3.49±1.35* | 5.72±0.56* | 2.91±0.19 |

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ 。

### 2.3 动物分组与给药

造模成功后,采用 2×2 析因实验设计将 32 只动物随机分成 4 组,每组 8 只,分别为模型组、中药外治组、中药内服组、中药内外合治组,依次给予生理盐水(相同给药体量)灌胃、外用 10%石榴皮多酚乳膏于两侧皮脂腺斑(每侧 1 mL/次)、加味三仁汤灌胃(680 mg·kg<sup>-1</sup> 地鼠体质量)、加味三仁汤灌胃联合外用 10%石榴皮多酚乳膏(方法、给药量与外治组、内服组相同),2 次/d,疗程 14 d。

### 2.4 皮脂腺斑总面积测量

每天观察各组动物的精神状态、皮毛、活动状态、二便情况。给药前及末次给药 24 h 后,金黄地鼠取仰卧位,剃毛后暴露两侧皮脂腺斑,强光照射下用照相机以同一焦距记录皮脂腺斑大体照片,并用游标卡尺测量并记录左右两侧皮脂腺斑的最大横径(transverse diameter, TD)、最大纵径(longitudinal diameter, LD),计算两侧皮脂腺斑总面积(DT×DL)之和。

### 2.5 皮脂腺斑组织形态病理变化观察

末次用药后 24 h,取金黄地鼠左侧皮脂腺斑组织,置于 10%甲醛固定液中固定待检。经脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色后,光学显微镜下观察各组组织病理学变化。

### 2.6 皮脂腺斑样本预处理方法

取模型组、中药内外合治组 2 组右侧皮脂腺斑样本,每组 6 份生物学重复样本进行非靶向脂质组学分析。非靶向脂质代谢物的提取:(1)称取 200 mg 的组织样品,进行液氮研磨;(2)向每个样品加入 120 μL 50%甲醇,震动充分混匀,提取样品中的脂质,常温静置 10 min;(3)提取液放-20℃过夜,沉淀样品中的蛋白质;(4)离心 20 min(4000 r/min),转移上清液脂质提取液到 96 孔板;(5)样品利用稀释液(异丙醇:乙腈:水=2:1:1,体积比)稀释脂质提取液;(6)每个样品等量取出 10 μL 稀释液混合成 QC 样品;(7)所有代谢样品在上样前放-80℃冰箱保存。

### 2.7 色谱-质谱条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,1.8 μm),柱温 35℃,流速为 0.4 mL/min。流动相为溶剂 A(含 0.1%甲酸的水)和溶剂 B(含 0.1%甲酸的乙腈)。液相梯度设置

为:0~0.5 min,5% B;0.5~7.0 min,5%~100% B;7.0~8.0 min,100% B;8.0~8.1 min,100%~5% B;8.1~10.0 min,5% B。

质谱条件:ESI 离子源,正、负离子采集模式。离子源的遮蔽气压 30 psi,辅气、鞘气压 60 psi。源温度 650℃。电压设置:正离子 5 kV,负离子-4.5 kV。信息依赖性模式采集数据。采用 2 组样本一一对应的方法进行样本的连续分析,在样本采集开始、每间隔 6 个样本、样本采集结束时进行一次 QC 品的扫描。用 QC 间的质量差距来校正整批实验的系统误差。

### 2.8 数据处理与统计学分析

原始数据经 MSConvert 软件转换为 mzXML 格式,利用 xcms 软件进行峰提取、保留时间矫正。使用基于 R 语言的 metaX 将 Compound Discoverer 3.1.0 导出的质谱原始数据进行归一化、峰提取和过滤、样本保留时间对齐、加合离子合并、缺失值填充等处理。结合 HMDB、KEGG、LipidMaps 等多个数据库得到各个离子的分子量、保留时间、峰面积和代谢物鉴定结果等信息。将鉴定所得差异代谢物数据通过 MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行通路富集分析。差异代谢物的统计采用单变量分析差异倍数和 Test 统计检验,进行 BH 校正得到 q-value,结合多变量统计分析 PLS-DA 得到变量权重(variable important for the projection, VIP)值,筛选差异表达的代谢离子,多元统计分析包括无监督主成分分析(PCA)、有监督最小二乘法判别分析(PLS-DA)。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, $T$  检验分析用于检测两组数据间差异的统计学意义,单因素方差分析用于检测 3 组或以上数据间差异的统计学意义,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 一般状况

肥甘饲料+湿热环境喂养下,金黄地鼠开始出现小便量多、色黄、异味大等“湿热”表现,伴随毛发潮湿油腻,呈杂乱状,大便便溏或黏稠色暗,垫料臭等“痰湿”症状,造模后限制动物活动空间后,金黄地鼠出现体形较肥胖,懒动,精神萎靡,喜蜷缩,进食减少等典型“湿热痰瘀”表现。与模型组、中药外治

组相比,中药内服组和中药内外合治组金黄地鼠毛发油腻程度好转,小便异味减少,大便稀溏程度减轻。

3.2 皮脂腺斑总面积比较

给药前,各组金黄地鼠皮脂腺斑总面积大小比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。给药后,中药内服组金黄地鼠皮脂腺斑总面积减小,与模型组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。中药外治组和中药内外合治组金黄地鼠皮脂腺斑总面积均明显减小,与模型组相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。详见表 2、图 1。

表 2 给药前后两侧皮脂腺斑面积比较( $\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | 皮脂腺斑总面积     |             |
|---------|---|-------------|-------------|
|         |   | 给药前         | 给药后         |
| 模型组     | 8 | 76.96±16.48 | 30.39±7.15  |
| 中药外治组   | 8 | 74.55±5.85  | 23.70±3.85* |
| 中药内服组   | 8 | 72.66±9.59  | 26.37±3.48  |
| 中药内外合治组 | 8 | 73.47±6.61  | 23.58±3.88* |
| F 值     |   | 0.316       | 3.506       |
| P 值     |   | 0.814       | 0.028       |

注:与模型组相比,\* $P<0.05$ 。

3.3 皮脂腺斑组织病理学观察

模型组皮脂腺腺体饱满,体积较大,腺叶数目较多,排列紧密整齐;中药外治组皮脂腺腺体变小,厚度变薄,重叠腺叶数减少,排列松散;中药内服组多数皮脂腺腺体厚度变薄,排列松散;中药内外合治组皮脂腺腺体明显变小,厚度明显变薄,数目明显减少,部分腺小叶中心区见崩解的无定形脂质团块向

皮肤表面移位,腺体周围炎性细胞浸润。与模型组比较,中药内外合治组皮脂腺斑显微结构变化最明显,故取模型组与中药内外合治组皮脂腺斑样本进一步行非靶向脂质组学研究。详见图 2。

3.4 皮脂腺斑代谢组学多元化分析

3.4.1 实验质量控制 将分析得到的 QC 样本基峰色谱图(base peak chromatogram, BPC)进行谱图重叠比较,总离子流图(total ion chromatogram, TIC)显示样本的色谱峰响应强度和保留时间基本重叠,重复性好,表明本实验的仪器、数据可靠性和稳定性良好。详见图 3。

3.4.2 代谢轮廓分析 筛选出的差异代谢物进行 PCA,见图 4,在 PCA 得分图中,图 4A 显示 QC 样本(蓝色)在图中原点附近紧密聚合,说明检测稳定。图 4B 显示模型组和中药内外合治组聚类情况良好,仅有个别离散值,表明两组数据检测结果稳定,所得差异物能反映样本间的生物学差异。

在 PCA 基础上引入有监督的差异辨别分析方法即 PLS-DA 分析,进一步观察两组间的差异,见图 4C。两组样本间较好分离,表明两组代谢模式存在差异。对模型进行 200 次随机排列组合实验,得 PLS-DA 模型的置换检验图,见图 4D。结果显示模型不存在过拟合情况,表明模型存在且可靠,可用于后续进一步模型差异代谢物的筛选。

3.4.3 代谢物定量 热图展示不同代谢物在样品间的重复性即聚类情况。图 5A 按照表达量的信息进

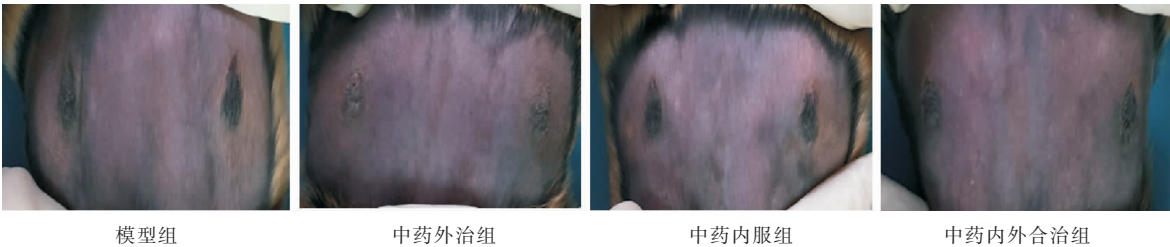


图 1 治疗后各组金黄地鼠皮脂腺斑大体图

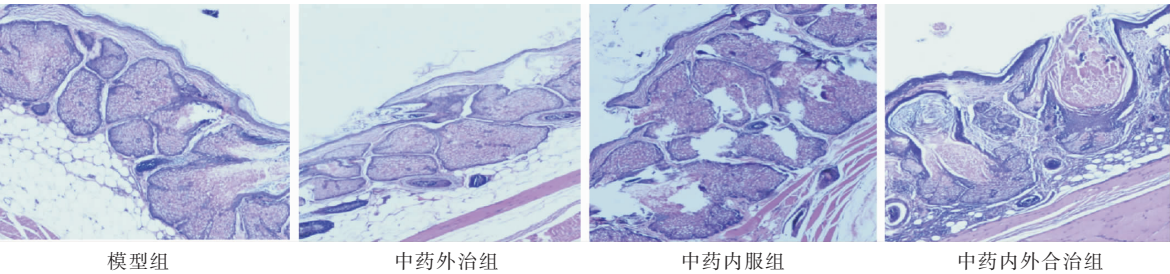


图 2 各组金黄地鼠皮脂腺斑病理变化(HE,×40)

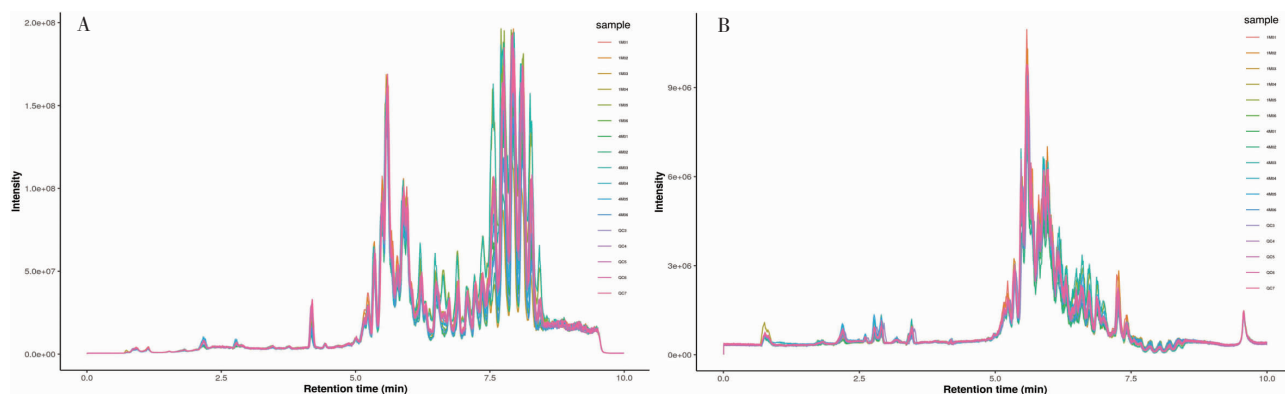


图3 QC 样本总离子流图

注:A.正离子模式;B.负离子模式。横坐标代表每个色谱图峰的保留时间,纵坐标代表峰的强度值。

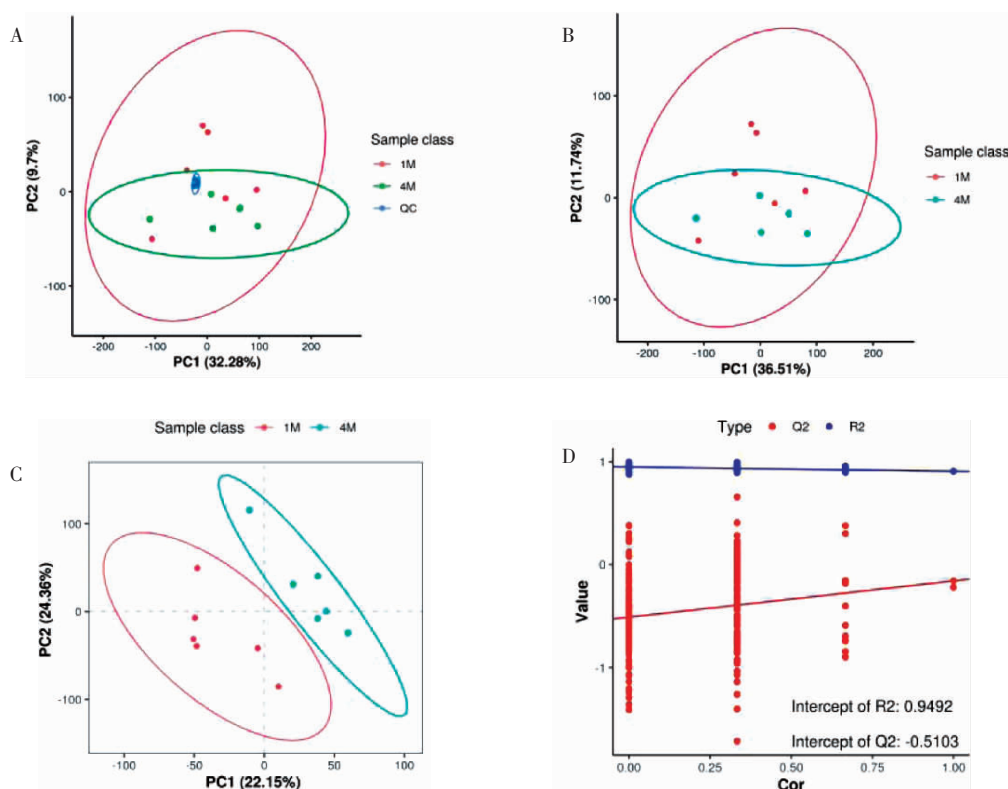


图4 两组样本代谢轮廓图

注:1M. 模型组;4M. 中药内外合治组;A.QC 样本 PCA 得分图;B.1M 和 4M 样本的 PCA 得分图;C. 1M 和 4M 样本的 PLS-DA 得分图;D. 1M 和 4M 样本的置换检验图。

行聚类,显示同组样本聚合良好,图 5B 说明造模及给药过程中代谢物脂类的脂肪酸(fatty acids, FA)、甘油酯(glycerolipids, GL)、甘油磷脂(glycerophospholipids, GP)、孕烯醇酮脂(prenol lipids, PR)、鞘脂(sphingolipids, SP)、固醇脂(sterol lipids, ST)的变化模式。

**3.4.4 差异代谢物筛选** 在两组对比所得的共同差异代谢物中,共鉴定出 13 个与金黄地鼠皮脂腺斑脂质代谢相关的潜在生物学标志物,为二酰基甘油葡萄糖醛酸苷(diacylglyceryl glucuronide, DGGA)、溶

血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC[42:5-SN2])、己糖神经酰胺及其硫苷脂(SHexCers)、卵磷脂(phosphatidylcholine, PC)、神经酰胺(ceramides, Cer)、二酰甘油酯(diacylglycerol, DG)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI)、鞘氨醇(sphingoid base, SPB)、鞘磷脂(sphingomyelin, SM)、TG、心磷脂(cardiolipin, CL)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC[40:11-SN2]),详见图 6。正、负离子模式下,以变异倍数分析(fold change analysis, FC)值 $\geq 1.8$ 或 $\leq 0.5$ ,

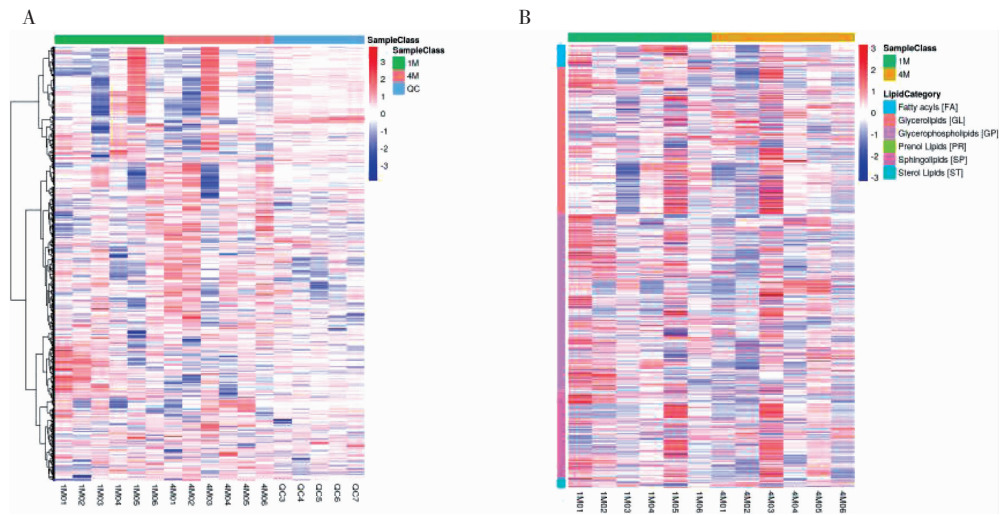


图 5 二级代谢物鉴定的热图

注:1M.模型组;4M.中药内外合治组;A.两组样本聚类情况;B.两组样本代谢物脂类的变化模式。图中不同颜色表示强度衰颜色从蓝色到红色表示强度由低到高。

VIP 值>1 和  $P<0.05$  作为筛选标准,比较两组皮脂腺斑脂质的整体差异表达倍数情况。与模型组比较,中药内外合治组差异倍数最大且显著相关的主

要脂质成分是 SM、SHexCer、CL、SPB、Cer、DG、TG、PS、LPC、PI。详见表 3。

3.4.5 代谢通路分析 根据差异代谢物结果,采用

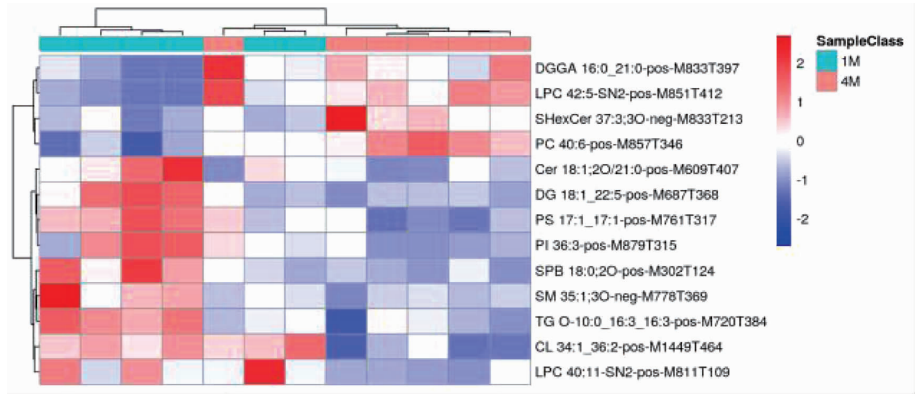


图 6 两组样本差异二级代谢物热图

注:图中不同颜色表示强度,颜色从蓝色到红色表示强度由低到高。1M.模型组;4M.中药内外合治组。

表 3 模型组和中药内外合治组差异脂质成分分析

| 序列号           | 差异代谢物               | CalMz     | 保留时间/min | 差异倍数(1M/4M) | P 值   | VIP   | 趋势 |
|---------------|---------------------|-----------|----------|-------------|-------|-------|----|
| neg-M778T369  | SM 35:1             | 777.557   | 6.148    | 1.517       | 0.020 | 2.054 | ↑  |
| neg-M833T213  | SHexCer 37:3        | 832.523   | 3.546    | 0.429       | 0.010 | 3.052 | ↓  |
| pos-M1449T464 | CL 34:1_36:2        | 1 449.023 | 7.738    | 1.828       | 0.010 | 2.870 | ↑  |
| pos-M302T124  | SPB 18:0            | 302.303   | 2.072    | 1.629       | 0.043 | 1.893 | ↑  |
| pos-M609T407  | Cer 18:1            | 608.589   | 6.778    | 1.516       | 0.006 | 2.159 | ↑  |
| pos-M687T368  | DG 18:1_22:5        | 686.563   | 6.127    | 1.539       | 0.044 | 1.890 | ↑  |
| pos-M720T384  | TG O-10:0_16:3_16:3 | 719.548   | 6.392    | 1.510       | 0.009 | 2.187 | ↑  |
| pos-M761T317  | PS 17:1_17:1        | 760.501   | 5.284    | 1.545       | 0.020 | 2.066 | ↑  |
| pos-M811T109  | LPC 40:11-SN2       | 810.546   | 1.815    | 1.625       | 0.016 | 2.317 | ↑  |
| pos-M833T397  | DGGA 16:0_21:0      | 832.652   | 6.624    | 0.618       | 0.011 | 2.304 | ↓  |
| pos-M851T412  | LPC 42:5-SN2        | 850.662   | 6.871    | 0.661       | 0.001 | 2.285 | ↓  |
| pos-M857T346  | PC 40:6             | 856.572   | 5.765    | 0.639       | 0.005 | 2.353 | ↓  |
| pos-M879T315  | PI 36:3             | 878.562   | 5.245    | 1.510       | 0.048 | 1.867 | ↑  |

注:↑升高,↓降低。1M.模型组;4M.中药内外合治组。

ggplot2 对 KEGG 通路富集。KEGG 通路富集分析发现代谢途径相关通路占主导地位,其他涉及细胞过程相关通路、环境信息处理相关通路、人类疾病相关通路、器官系统相关通路。代谢途径相关通路的脂质代谢通路富集分析结果显示,经中药内外合治干预后,对差异代谢物影响显著的代谢通路为亚油酸代谢、GL 代谢、花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢,影响不显著的代谢通路是 SP、GP 代谢。详见图 7。

#### 4 讨论

痤疮病因复杂,多采用综合手段治疗。脂质代谢紊乱或许是导致痤疮发生的主要原因,现代医学改善脂质代谢通常使用维甲酸类、性激素等药物,其生殖毒性、肝功能损害、胃肠道反应等不良反应发生率高,迫使很多患者寻求中医药治疗。多项研究结果表明,三仁汤及三仁汤加减方具有很好的调脂、改善脂代谢紊乱的作用<sup>[16-19]</sup>。外用石榴皮多酚乳膏直达病所,经皮吸收,抑制皮脂分泌<sup>[20]</sup>。故本研究从改善脂质代谢角度出发,观察加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏内外合治对湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型一般状况、皮脂腺斑总面积及组织病理学变化的影响。经中药内外合治后,金黄地鼠相关代谢紊乱情况改善。与模型组相比,中药外治、中药内外合治均能使皮脂腺斑总面积缩小,有

效抗皮脂腺斑增生。组织病理学显示,二者内外合治后,湿热痰瘀型金黄地鼠皮脂腺斑腺体变小、厚度变薄、数目减少,腺小叶中心区无定形的脂质团块逐渐向皮肤表面移位,组织结构改善最明显。

脂质成分种类繁多,结构变化多端,很多分析脂质的方法都有一定的局限性。脂质代谢组学分析技术可从整体角度认知痤疮脂质含量及成分改变,评估皮肤脂质屏障功能,为监测脂质稳态在痤疮发生发展及治疗中的作用提供新的思路。我们采用非靶向脂质代谢组学分析加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏内外合治干预湿热痰瘀型金黄地鼠痤疮模型,旨在发现内外结合治疗共同发挥作用机制的可能作用代谢产物,为使用内外合治综合治疗手段治疗湿热痰瘀型痤疮提供有力的科学证据。

脂质主要由皮脂腺分泌和排泄。它是一种混合物,其中包含有多种脂类物质,主要有饱和及不饱和游离脂肪酸、甘油酯类、蜡酯类、固醇类、角鲨烯及神经酰胺等<sup>[21-22]</sup>。一项对青年男性痤疮患者的脂质分析研究显示,甘油磷脂类、脂肪酸类、固醇类含量显著升高,孕烯醇酮脂类和糖脂类含量降低<sup>[23]</sup>。从轻度到中度青春期痤疮,TG、DG、FA、Cer 的相对平均含量及不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acid, UFA)水平显著升高。同时,TG、UFA、Cer 含量与痤疮严重程度呈正相关关系<sup>[24]</sup>。另一项利用脂质组学研究青少年痤疮

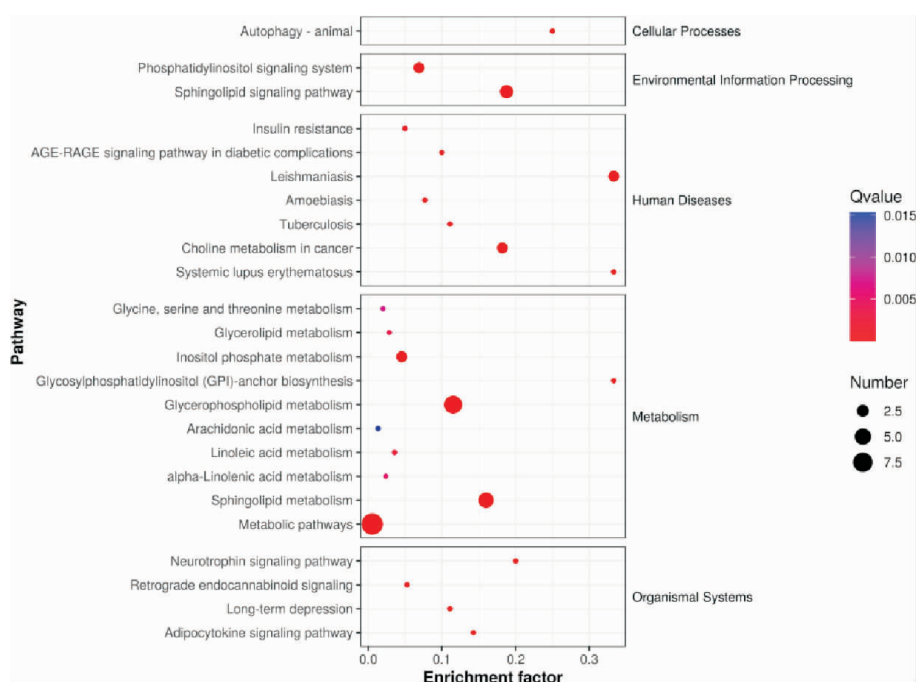


图 7 差异代谢物 KEGG 通路富集图

注:Enrichment factor 表示位于该 KEGG 的差异代谢物个数/位于该 KEGG 的总代谢物数, $P$  值越小,KEGG 富集程度越高。图中点的大小代表富集到相应通路上的差异显著代谢物个数。

疮皮脂功能紊乱的研究发现,痤疮患者皮脂中含有丰富的甘油二酯,其次是脂肪酰类、固醇脂类,且皮脂成分紊乱程度与痤疮严重度呈正相关<sup>[25]</sup>。

本研究基于液相色谱-串联质谱联用技术从整体角度发现,加味三仁汤联合石榴皮多酚乳膏的内外合治手段对湿热痰瘀型痤疮动物模型的作用机制主要通过调节皮脂亚油酸代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢,从而影响脂肪酸类、甘油酯含量的表达,发挥治疗痤疮的作用。

## 参考文献

- [1] CLAYTON R W, GÖBEL K, NIESSEN C M, et al. Homeostasis of the sebaceous gland and mechanisms of acne pathogenesis[J]. *British Journal of Dermatology*, 2019, 181(4): 677-690.
- [2] MELNIK B C. Acne vulgaris: The metabolic syndrome of the pilosebaceous follicle[J]. *Clinics in Dermatology*, 2018, 36(1): 29-40.
- [3] MELNIK B C. Linking diet to acne metabolomics, inflammation, and comedogenesis: an update[J]. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2015, 15(8): 371-388.
- [4] 俞若熙,倪 诚,王 琦.王琦教授从湿热体质论治痤疮的理论探讨[J].*中华中医药杂志*,2012,27(4):878-881.
- [5] 白书仙,张 波,张 洁,等.痤疮肝郁脾虚证临床研究[J].*陕西中医*, 2021,42(3):344-346.
- [6] 李刘坤.吴鞠通医学全书[M].2版.北京:中国中医药出版社,2015.
- [7] 吴雄志.吴述温病研究·伏邪[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2017: 266-267.
- [8] 魏 露,吴淑辉,张 曦,等.石榴皮多酚乳膏对金黄地鼠皮脂腺斑 LXR $\alpha$ /SREBP-1 信号通路的影响[J].*中国皮肤性病杂志*, 2020,34(10):1134-1138.
- [9] 高 凡,朱明芳,杨逸璇,等.石榴皮多酚乳膏抑制 NLRP3 炎性小体抗炎抗痤疮的机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(7):1003-1009.
- [10] 胡 彬,杨逸璇,杨婉婷,等.不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2018, 38(4):397-401.
- [11] 刘恩岐.人类疾病动物模型[M].2版.北京:人民卫生出版社,2014: 15-16.
- [12] 魏 伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:70-73.
- [13] VEGA-NAREDO L, TOMAS-ZAPICO C, COTO-MONTES A. Potential role of autophagy in behavioral changes of the flank organ[J]. *Autophagy*, 2009, 5(2): 265-267.
- [14] 宋颖星.分消走泄法改善痰湿瘀热型 IGT 大鼠糖脂代谢的实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [15] 罗 丹,李云鹏,马文校,等.三仁汤对脾胃湿热证大鼠 IL-2、胸腺和脾脏指数影响的实验研究[J].*时珍国医国药*,2015,26(1):68-69.
- [16] 周燕萍,高清华,李华峰,等.3种温病治法对温病湿热证模型血脂影响的对比研究[J].*中医药学刊*,2006,(2):368-369.
- [17] 贾月嫦,隋艳华,王树辉,等.三仁汤对温病湿热证大鼠模型脂质代谢影响的实验观察[J].*贵阳中医学院学报*,2014,36(5):24-26.
- [18] 刘卫红,张 琪,张 蕾,等.三仁汤对大鼠高脂血症模型血脂及代谢产物谱的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2011,31(1):52-57.
- [19] 陈 晶.调理三焦法治疗代谢综合征的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2006.
- [20] 吴淑辉,朱明芳,魏 露,等.石榴皮多酚对金黄地鼠皮脂腺斑及 AKT/Sox9 信号通路的影响[J].*中华皮肤科杂志*,2021,54(8):705-708.
- [21] PAPPAS APOSTOLOS. Epidermal surface lipids[J]. *Dermato-Endocrinology*, 2009, 1(2): 72-76.
- [22] THIBOUTOT D. Regulation of human sebaceous glands[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 123(1): 1-12.
- [23] ZHOU M, GAN Y, HE C, et al. Lipidomics reveals skin surface lipid abnormality in acne in young men[J]. *The British Journal of Dermatology*, 2018, 179(3): 732-740.
- [24] ZHOU M Y, YANG M L, ZHENG Y M, et al. Skin surface lipidomics revealed the correlation between lipidomic profile and grade in adolescent acne[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2020, 19(12): 3349-3356.
- [25] CAMERA E, LUDOVICI M, TORTORELLA S, et al. Use of lipidomics to investigate sebum dysfunction in juvenile acne[J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(6): 1051-1058.

(本文编辑 苏 维)