

舒利迭联合孟鲁司特钠治疗支气管哮喘的代谢组学研究

汪萍萍, 李小惠, 何叶, 肖梦(四川省人民医院干部医疗科, 成都 610072)

摘要: 目的 基于代谢组学探讨舒利迭联合孟鲁司特钠对支气管哮喘作用的机制。方法 以 2016 年 5 月—2018 年 12 月收治的 140 例支气管哮喘患者为对象, 均行舒利迭联合孟鲁司特钠治疗, 并采用 LC-MS/MS 进行代谢组学检测, 考察联合用药的治疗效果。结果 治疗后患者的潜在性代谢标志物锌、多巴胺、半胱氨酸、胆碱、乙酰乙酸、同型半胱氨酸、腺嘌呤、组胺以及鸟氨酸等与治疗前有显著差异, 锌、多巴胺和半胱氨酸表现出上升趋势, 其他物质则表现出降低趋势。结论 舒利迭联合孟鲁司特钠不仅能调节支气管哮喘患者的氨基酸代谢, 促使其免疫功能增强, 而且还能提升患者抗凋亡能力以及抗氧化能力, 通过改善氨转运, 对神经递质与细胞信号进行调控, 同时对激素水平以及能量代谢进行调节。关键词: 代谢组学; 舒利迭; 孟鲁司特钠; 支气管哮喘; 血浆代谢成分

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)20-2622-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.20.008

引用本文: 汪萍萍, 李小惠, 何叶, 等. 舒利迭联合孟鲁司特钠治疗支气管哮喘的代谢组学研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2622-2626

Metabolomics Study of Sulidate Combined with Montelukast Sodium in the Treatment of Bronchial Asthma

WANG Pingping, LI Xiaohui, HE Ye, XIAO Meng(Cadre Medical Department, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of the effects of sulidate combined with montelukast sodium on bronchial asthma based on metabolomics. **METHODS** A total of 140 elderly patients with bronchial asthma from May 2016 to December 2018 were treated with sulidate combined with montelukast sodium, and LC-MS/MS-based on metabolic analysis was performed to assess the therapeutic benefits of the combination medication. **RESULTS** Potential metabolic markers of elderly patients after treatment were zinc, dopamine, cysteine, choline, acetoacetate, homocysteine, adenine, histamine, and ornithine, and the first three substances had an upward trend, while other substances showed a downward trend. After treatment, the plasma metabolism of patients was significantly different from that before treatment. **CONCLUSION** Sulidate combined with montelukast sodium can not only regulate the amino acid metabolism of patients with bronchial asthma, and enhance their immune function, but also improve their anti-apoptosis and anti-oxidation capabilities. It can regulate the level of neurotransmitters by inhancing ammonia transport, regulate cellular signaling, hormone levels and energy metabolism.

KEYWORDS: metabolomics; sulidate; montelukast; bronchial asthma; plasma metabolic component

支气管哮喘为呼吸系统慢性疾病, 近年来发生率呈升高趋势, 国内发生率约 4%左右。该病发病机制尚未明确, 且当前无特效性治疗措施, 西医临床治疗以抗感染、祛痰、平喘以及止咳等对症措施为主, 但易复发哮喘, 甚至导致患者的耐受性受影响^[1-2]。舒利迭是由沙美特罗和丙酸氟替卡松复合制成的干粉吸入剂, 丙酸氟替卡松为糖皮质激素。孟鲁司特是一种强效选择性白三烯受体拮抗剂, 其通过与呼吸道白三烯受体特异性结合而阻断白三烯

的病理作用。研究发现, 孟鲁司特与糖皮质激素合用具有协同作用, 抑制和拮抗炎症因子, 抑制各种刺激源导致的速发性和迟发性炎症反应。经检索, 舒利迭联合孟鲁司特钠在临床中的应用报道较多, 人群涉及从儿童到老年人的各个年龄段患者^[3-5], 可见临床舒利迭联合孟鲁司特钠对支气管哮喘的治疗应用已较为广泛, 但代谢组学的机制研究未曾见相关报道。因此, 本实验以 140 例支气管哮喘患者为对象展开研究, 从代谢组学角度分析

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ031)

作者简介: 汪萍萍, 女, 硕士, 住院医师 E-mail: zxyhxt111@163.com

舒利迭联合孟鲁司特钠对支气管哮喘的作用机制,旨在进一步探讨舒利迭联合孟鲁司特钠机制,进而促进支气管哮喘转归。

1 资料与方法

1.1 研究资料

以四川省人民医院 2016 年 5 月—2018 年 12 月收治的 140 例支气管哮喘患者为对象,性别 77 例男性与 63 例女性;年龄 21~74 岁,平均(45.27±6.27)岁。

1.2 诊断标准/纳入标准/排除标准

以《支气管哮喘防治指南》^[6]中相关诊断标准为参考:①反复发作喘息、气急,伴或不伴胸闷或咳嗽,夜间及晨间多发,常与接触变应原、冷空气、物理、化学性刺激以及上呼吸道感染、运动等有关;②发作时双肺可闻散在或弥漫性哮鸣音,呼气相延长;③上述症状和体征可经治疗缓解或自行缓解。

纳入标准:①满足支气管哮喘急性发作期诊断标准;②患者或其家属签署知情同意书。

排除标准:①支气管哮喘病情危重,或呈持续状态;②处于妊娠期;③处于哺乳期;④并发严重性心肺功能不全;⑤并发精神类疾病;⑥入组前 7 d 曾接受治疗。

1.3 材料

LTQ Orbitrap Elite 高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技); Kinetex 2.6 μ HILIC 100A 色谱柱(美国 Phenomenex 公司); TG16B 离心机(常州金坛良友仪器公司); AA320N Plus 原子吸收分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)。

乙腈及甲醇均购自美国 Fisher Scientific;乙酸及乙酸铵溶液均购自 Dikmapure 公司。

1.4 方法

1.4.1 治疗方法 患者入院后均进行常规对症治疗,如抗感染、维持水电解质平衡、导管吸氧、纠正酸碱失衡、补液等,根据患者病情程度轻重,调整不同治疗方案。所有患者在常规治疗的基础上采用沙美特罗替卡松粉吸入剂(主要成分为沙美特罗和丙酸氟替卡松,生产厂家: Glaxo Wellcome Production;批准文号:进口药品注册证号 H20150324),每次 1 吸(50 μg 沙美特罗和 100 μg 丙酸氟替卡松),2 次·d⁻¹吸入治疗;孟鲁司特钠片(鲁南贝特制药有限公司,国药准字: H20083330) 10 mg·次⁻¹,每日 1 次,连续治疗 3 个月。

1.4.2 检验方法^[7] 所有患者均展开代谢组学检测:①治疗前 24 h 内及疗程结束后 24 h 内采样完毕,分别抽取患者血样 5 mL,于常温环境中静置 1 h 后,将其放置离心机中,以 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min(有效半径 13.5 cm),取上清液液氮暂存,并保存于-80 °C 的环境中。②于 4 °C 环境中复溶血浆,予以乙腈预冷,将其放置于 4 °C 环境中过夜。复溶血浆 100 μL 与乙腈 300 μL 混匀,沉淀蛋白,以 16 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,按照 1:1 加纯水稀释混匀,再次进行 16 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,4 °C 冰箱保存。③采用原子吸收光谱法测定血锌。④以高分辨质谱仪对血样分离、检测以及分析。色谱条件: Phenomenex Kinetex HILIC 100A 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm);进样量 5 μL;柱温 40 °C;流速 0.3 mL·min⁻¹;流动相 A: 乙腈(5%)与水(95%)配比,乙酸含量 0.05%,乙酸铵溶液量 2 mmol·L⁻¹;流动相 B: 水(5%)与乙腈(95%)配比,乙酸含量 0.05%,乙酸铵溶液量 2 mmol·L⁻¹。⑤梯度洗脱: 0.01~3.00 min, 0%A; 3.00~15.02 min, 0%→100%A; 15.02~18.02 min, 100%A; 18.02~18.10 min, 100%→0%A; 18.10~23.02 min, 0%A。

质谱条件: 正离子模式,离子化温度 500 °C,质荷比 m/z 50~950,喷雾电压 5 500 V,气帘气 30 psi,碰撞电压 5 eV,去簇电压 60 V,射入电压 10 V。

1.5 数据处理

高分辨质谱获取原始数据,由 MarkerViewTM 1.2.1 代谢组学软件展开峰对齐、峰识别以及峰过滤,并获得峰面积、质荷比以及保留时间的二维数据阵。以 SIMCA V14.0 软件对各项数据展开多变量分析,分析方法有正交偏最小二乘判别分析法以及主成分分析法,进行置换检验,对正交偏最小二乘判别模型稳健状况进行检测,避免过度拟合。通过网上数据库对分析结果进行检索,明确生物标志物类型,并以 MarkerViewTM 1.2.1 代谢组学软件展开 t 检验,对组间差异情况进行分析。

2 结果

2.1 血浆代谢数据的主成分分析结果

对血浆代谢数据的主成分展开分析,于正离子模式获取到主成分共 2 个,累积 $R^2X=0.639$, $Q^2=0.609$,即该主成分分析模型可对 2 组间代谢物的差异情况进行解析,见图 1。

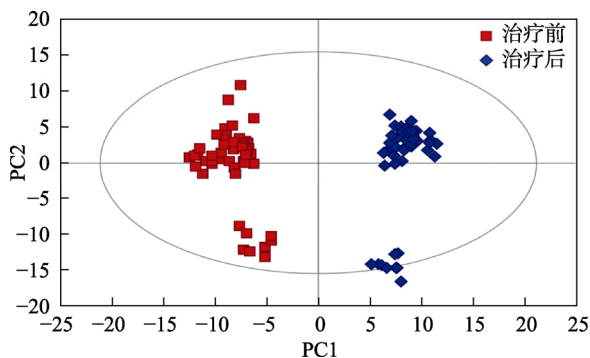


图1 支气管哮喘患者治疗前后的主成分分析图
Fig. 1 Principal component analysis diagram of patients with bronchial asthma before and after treatment

由图1可见,支气管哮喘患者治疗前后,第一主成分对两者进行完全分割,两者可明确区分,存在分离趋势,表明舒利迭联合孟鲁司特钠治疗前与治疗后相比,支气管哮喘患者的代谢成分对比有显著差异。

2.2 血浆代谢数据的正交偏最小二乘判别分析结果

以正交偏最小二乘判别分析法对支气管哮喘患者舒利迭联合孟鲁司特钠治疗前、后的血浆代谢数据进行分析,分析结果显示模型的质量参数是:主成分有1个,正交成分有1个, $R^2X=0.299$, $Q^2=0.979$, $R^2Y=0.990$ 。该模型预测能力是 $Q^2=0.979$,30%的 X 变量(R^2X)能够对舒利迭联合孟鲁司特钠治疗前及治疗后的99.0%差异(R^2Y)进行有效解释,可证实此次正交偏最小二乘判别分析结果的可靠性,见图2。

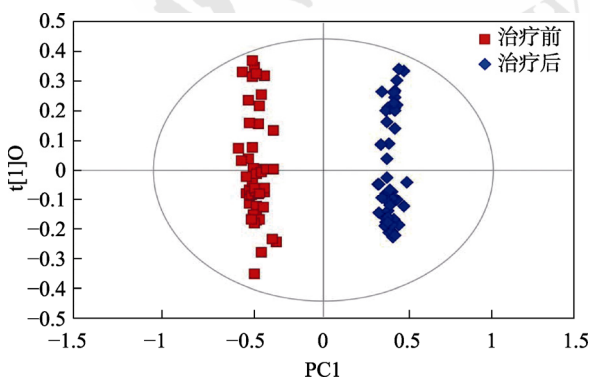


图2 支气管哮喘患者治疗前后的正交偏最小二乘判别分析图
Fig. 2 Orthogonal partial least squares discriminant analysis diagram of patients with bronchial asthma before and after treatment

由图2可见,舒利迭联合孟鲁司特钠治疗前与治疗后相比,支气管哮喘患者的代谢成分对比

有显著差异。该模型的置换检验截距 $R^2=0.320$,而 $Q^2=-0.360$,表明该模型稳健性较低,见图3。

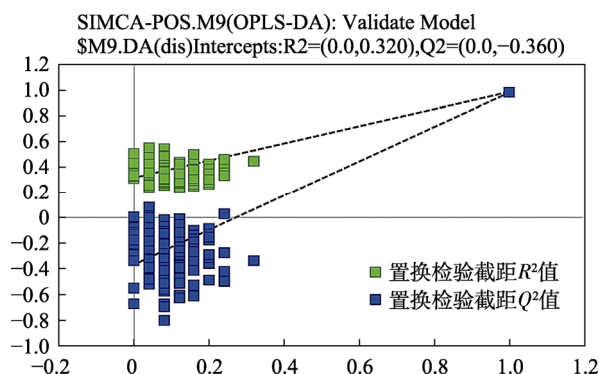


图3 支气管哮喘患者治疗前后的正交偏最小二乘判别分析置换检验图

Fig. 3 Orthogonal partial least squares discriminant analysis permutation test diagram before and after treatment in patients with bronchial asthma

2.3 血浆代谢数据的正交偏最小二乘判别分析 S-plot 图

载荷图能够展示出所有代谢物的分布情况,图上圆点用于表示各种代谢物质。对于各样本分类,与原点间的距离越远的物质重要性越高,图中两侧物质即对2组差异进行区别的可能代谢标志物,见图4。

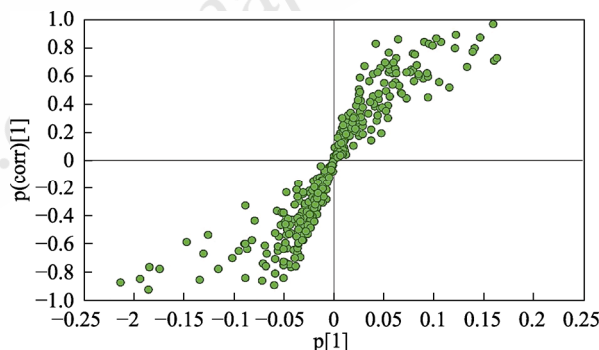


图4 支气管哮喘患者治疗前后的正交偏最小二乘判别分析 S-plot 图

Fig. 4 Orthogonal partial least squares discriminant analysis S-plot of patients with bronchial asthma before and after treatment

2.4 代谢标志物

以正交偏最小二乘判别分析模型对代谢数据中差异性贡献偏大的变量因子进行提取,结合 t 检验 P 值($P<0.05$)及载荷图的代谢物分布,对差异性代谢物各项数据信息进行筛选,采用在线数据库检索确定数据,查询可能代谢物质,并结合变量二级质谱图、精确分子量以及保留时间等信息

缩小筛选范围,对差异性代谢物质进行推测。结果显示,舒利迭联合孟鲁司特钠治疗支气管哮喘后的代谢标志物有 9 种,分别是锌、多巴胺、半胱氨酸、胆碱、乙酰乙酸、同型半胱氨酸、腺嘌呤、组胺以及鸟氨酸,其中前 3 种物质表现出上升趋势,而其他物质表现出降低趋势,见表 1。

表 1 支气管哮喘患者治疗前后的差异性潜在代谢标志物
Tab. 1 Different potential metabolic markers in patients with bronchial asthma before and after treatment

重要变量因子	<i>t</i> 值	质荷比	保留时间/ min	名称	变化趋势
1.662 19	1.99×10^{-10}	106.02	10.70	锌	↑
1.270 09	1.19×10^{-7}	155.10	6.50	多巴胺	↑
1.289 97	1.88×10^{-9}	121.99	10.59	半胱氨酸	↑
3.237 59	1.60×10^{-19}	104.05	10.68	胆碱	↓
1.091 18	3.79×10^{-9}	146.88	12.90	乙酰乙酸	↓
2.733 60	7.01×10^{-9}	135.91	7.19	同型半胱氨酸	↓
1.242 71	9.00×10^{-14}	157.99	7.00	腺嘌呤	↓
1.987 46	2.09×10^{-22}	94.11	1.40	组胺	↓
1.739 02	3.90×10^{-11}	149.97	19.20	鸟氨酸	↓

3 讨论

代谢组学即于特定条件、特定时间范围内对某生物系统中所有的小分子代谢物进行定性定量分析,并对生物内源性代谢物整体、生物内源性代谢物对内外因变化应答规律进行定量描述的一种科学^[8-11]。代谢组学以“人”为研究对象,重点分析人对于遗传修饰、外源性刺激以及环境改变等因素所进行的代谢应答动态变化及其全貌^[12]。

本研究基于代谢组学分析舒利迭联合孟鲁司特钠对支气管哮喘作用的机制,结果发现支气管哮喘患者经舒利迭联合孟鲁司特钠治疗前后,其代谢谱存在差异,并推测出其潜在代谢标志物有锌、多巴胺、半胱氨酸、胆碱、乙酰乙酸、同型半胱氨酸、腺嘌呤、组胺以及鸟氨酸,其中前 3 种物质表现出上升趋势,而其他物质则表现出降低趋势,推测上述 9 种物质可能是舒利迭联合孟鲁司特钠治疗支气管哮喘后的潜在生物标志物,且舒利迭联合孟鲁司特钠不仅可对支气管哮喘病理因素进行调整,同时还能对患者机能产生调节作用,从而改善病情,促进疾病转归。

半胱氨酸物质含量的升高,鸟氨酸以及同型半胱氨酸物质含量的降低,可能是由治疗后患者抗氧化能力及其免疫功能得到提升,氨基酸代谢功能与氨转运功能得到改善所致;而锌含量升高,原因可能是支气管哮喘患者经舒利迭联合孟鲁司特钠治

疗后,其锌摄取能力得到提升;胆碱含量的降低,可控制乙酰胆碱合成量,并对胆碱能神经系统的兴奋性进行有效控制;组胺含量的减少,可能是因为嗜酸性粒细胞等脱颗粒得到调节所致^[13-17]。多巴胺为人体中的一种神经递质,由大脑合成,在外周神经系统、中枢神经系统中分布,可对中枢神经、肾脏以及激素产生调节作用、应激作用^[18]。支气管哮喘的出现,其支气管的平滑肌出现痉挛问题,致使通气障碍情况发生,而人体支气管的平滑肌中存在大量 β 受体,在多巴胺作用下,可兴奋 β 受体,使支气管恢复扩张状态,同时还能兴奋患者肥大细胞膜组织表面的 β 受体,对脱颗粒以及介质释放进行抑制,促使患者血管通透性得到充分降低^[19]。本次研究中,支气管哮喘患者经舒利迭联合孟鲁司特钠治疗后,血浆内多巴胺物质含量上升,表明舒利迭联合孟鲁司特钠可对支气管哮喘患者支气管神经产生调节作用,从而缓解病情。Sommer 等^[20]研究发现,受炎性细胞物质、炎性介质聚集因素影响,支气管哮喘患者气道炎症症状多存在迁延性特征,而气道上皮细胞组织的屏障被破坏,会使炎症症状加重,对平滑肌细胞组织产生持续性刺激作用,不仅会使气道壁厚度增加,而且还可能会有气道重塑情况出现,导致气道阻力异常增加。乙酰乙酸属于脂肪酸 β 氧化的一种中间产物,是酮体的构成物质之一,本研究发现乙酰乙酸为支气管哮喘患者的潜在生物标志物,且支气管哮喘患者经舒利迭联合孟鲁司特钠治疗后,其血浆中乙酰乙酸物质含量明显降低,究其原因,可能是支气管哮喘患者经舒利迭联合孟鲁司特钠治疗后,其肺部通气功能得到改善,同时缺氧现象得到纠正,不仅耗能有效降低,而且糖的代谢功能进一步增加,从而对脂肪酸的分解功能进行充分控制,缓解通气障碍程度,控制呼吸机耗能,并且降低乙酰乙酸水平^[21]。可见,舒利迭联合孟鲁司特钠对支气管哮喘的另一作用机制即改善肺部通气能力,对患者体内的脂代谢功能以及糖代谢功能产生调节作用。腺嘌呤不仅是腺苷酸合成中的重要参与物质,而且还是腺苷酸中的重要组成部分^[22]。支气管哮喘患者病情发作时,神经机制会使其炎症程度增加, β -肾上腺素受体功能异常降低。Mondo 等^[23]研究发现,腺嘌呤能促使人体呼吸道收缩,通过对腺嘌呤含量进行有效控制,对于支气管舒张起着促进作用。本

次研究发现,舒利迭联合孟鲁司特钠用于治疗支气管哮喘后,患者腺嘌呤含量明显降低,其作用机制可能是通过控制支气管哮喘患者病情,对血浆中腺嘌呤产生作用,促使其生成转化为三磷酸腺苷,并催化生成大量环磷酸鸟苷,控制腺苷酸降解,降低腺嘌呤含量。

综上所述,舒利迭联合孟鲁司特钠不仅能调节支气管哮喘患者的氨基酸代谢,促使其免疫功能增强,而且还能提升患者抗凋亡能力以及抗氧化能力,通过改善氮转运,对神经递质与细胞信号进行调控,同时对激素水平以及能量代谢进行调节。

REFERENCES

- [1] HALL S C, AGRAWAL D K. Vitamin D and bronchial asthma: An overview of data from the past 5 years[J]. Clin Ther, 2017, 39(5): 917-929.
- [2] RAN S, SUN F F, SONG Y, et al. Research progress of three major substances metabolism of asthma based on metabolomics[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(20): 2612-2617.
- [3] 张敏. 孟鲁司特钠联合舒利迭治疗支气管哮喘疗效观察[J]. 中国社区医师, 2021, 37(6): 90-91.
- [4] 陈素哲, 赵涛, 范伟, 等. 孟鲁司特钠联合舒利迭对毛细支气管炎再发喘息的预防及对 Th1/Th2 的影响[J]. 重庆医学, 2018, 47(15): 2074-2076.
- [5] XIAO Q L, QIN X M. Effects of salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder in combination with montelukast on pulmonary function and serum inflammatory cytokines in children with cough variant asthma[J]. Chin J Prim Med Pharm(中国基层医药), 2018, 25(2): 182-185.
- [6] 罗军, 季建华. 支气管哮喘防治指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [7] LIN Y. Research on the changing biorhythm of Fei-we-qi deficiency syndrome and intervention by compound based on metabonomics[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2014.
- [8] ZENG X F, CAI H F, YANG J, et al. Metabolomics and pharmacokinetics study on the cardiotoxicity of doxorubicin in rat[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(6): 666-674.
- [9] DUAN K, GAO X, GENG T, et al. Study on the therapeutic mechanism of Guizhi Fuling Capsules and its main components for treatment of primary dysmenorrhea syndrome by serum metabolomics[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(18): 2066-2074.
- [10] XIANG Y L, FANG P F. Advance in hepatotoxicity biomarkers based on pharmacometabolomics[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(11): 641-646.
- [11] REINKE S N, GALLART-AYALA H, GÓMEZ C, et al. Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity[J]. Eur Respir J, 2017, 49(3): 1601740.
- [12] MU C Z. Observation on the clinical efficacy of seretide combined with montelukast sodium in the treatment of bronchial asthma[J]. China Mod Dr(中国现代医生), 2017, 55(33): 40-42.
- [13] AKAIKE T, IDA T, WEI F Y, et al. CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1177.
- [14] MACEDO J P, CURRIER R B, WIRDNAM C, et al. Ornithine uptake and the modulation of drug sensitivity in *Trypanosoma brucei*[J]. FASEB J, 2017, 31(10): 4649-4660.
- [15] KARMIN O, SLOW Y L. Metabolic imbalance of homocysteine and hydrogen sulfide in kidney disease[J]. Curr Med Chem, 2018, 25(3): 367-377.
- [16] BECKHAUS A A, GARCIA-MARCOS L, FORNO E, et al. Maternal nutrition during pregnancy and risk of asthma, wheeze, and atopic diseases during childhood: A systematic review and meta-analysis[J]. Allergy, 2015, 70(12): 1588-1604.
- [17] KRANER M E, LINK K, MELZER M, et al. Choline transporter-like1 (CHER1) is crucial for plasmodesmata maturation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 2017, 89(2): 394-406.
- [18] STARKWEATHER C K, BABAYAN B M, UCHIDA N, et al. Dopamine reward prediction errors reflect hidden-state inference across time[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(4): 581-589.
- [19] LÜ X, MO B W. Progress in the research of epigenetic regulation of airway smooth muscle cells in asthma[J]. Basic Clin Med(基础医学与临床), 2017, 37(3): 419-421.
- [20] SOMMER B, FLORES-SOTO E, GONZALEZ-AVILA G. Cellular Na⁺ handling mechanisms involved in airway smooth muscle contraction (Review)[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(1): 3-9.
- [21] TANG X, WU F, FAN J S, et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-33 expression by microRNA-200 in bronchial asthma[J]. Mol Ther, 2018, 26(7): 1808-1817.
- [22] WANG C X, SONG H L, LIU W Q, et al. Synthesis and fungicidal activities of a novel series of adenine-9-yl derivatives containing acylhydrazones[J]. J Mol Sci(分子科学学报), 2017, 33(1): 43-48.
- [23] MONDO S J, DANNEBAUM R O, KUO R C, et al. Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi[J]. Nat Genet, 2017, 49(6): 964-968.

收稿日期: 2021-09-16

(本文责编: 曹粤锋)