卓越医见：中药药理学与疾病 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003853

# 野马追倍半萜内酯对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的保护作用研究

罗 陈，杨 燕，令狐莉，夏 炼，周可云，刘传新，罗先钦
（重庆医科大学中医药学院，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：旨在通过代谢组学探讨野马追倍半萜内酯（sesquiterpene lactones of *Eupatorium lindleyanum* DC.，SLEL）对脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导急性肺损伤（acute lung injury，ALI）模型大鼠的保护作用。**方法**：将48只SD雄性大鼠随机分为空白对照组（control group，CG）、模型对照组（model group，MG）、SLEL低、中、高剂量组（50、100、200 mg/kg）和阳性对照组（醋酸地塞米松片，5 mg/kg），其中CG组和MG组给予磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS），各组灌胃给药体积均为10 mL/kg，每天给药1次，连续7 d。末次给药后1 h，除CG组外，其余各组大鼠均气管滴注5 mg/kg LPS建立ALI大鼠模型。造模24 h后，腹主动脉取血并收集左肺肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）。采用瑞氏-吉姆萨染色法计数BALF的总炎性细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞数；酶联免疫吸附测定法检测血清和BALF中白细胞介素-18（interleukin-18，IL-18）和干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）的含量；苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变；蛋白免疫印迹技术（Western blot）检测肺组织紧密连接蛋白-1（zonula occludens-1，ZO-1）和闭合蛋白（Occludin）的蛋白表达；实时定量逆转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR）法检测肺脏IL-18、IFN-γ、ZO-1和Occludin的mRNA表达；超高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱（UPLC-ESI-MS/MS）对大鼠的血清和肺组织进行非靶向代谢组学分析。**结果**：与MG组相比，SLEL各剂量组均明显降低肺组织的湿干重比、肺系数和BALF的总炎性细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞的数量；均明显降低血清和BALF中IL-18和IFN-γ的含量以及肺组织中IL-18和IFN-γ的mRNA表达；也能够明显促进ZO-1和Occludin的蛋白和mRNA表达；光镜下可见肺组织水肿程度、肺泡腔内出血和炎症细胞浸润明显减轻，显示对ALI大鼠具有一定的保护作用；非靶向代谢组学研究结果显示SLEL血清和肺组织分别有91和33种代谢产物差异明显，其中血清中主要差异代谢物为鞘氨醇、L-乳酸、烟酸D-核苷酸及甲羟戊酸-5P，肺组织中主要差异代谢物为牛磺胆酸，提示SLEL可能主要影响血清的鞘脂、丙酮酸、烟酸和烟酰胺、色氨酸等代谢通路以及肺组织的牛磺酸和亚牛磺酸等代谢通路而改善ALI。**结论**：SLEL对LPS诱导ALI大鼠具有明显保护作用，其作用机制可能与抑制炎症因子、改善肺部屏障功能以及调控相关代谢通路相关。

【关键词】野马追倍半萜内酯；急性肺损伤；肺部屏障；代谢组学
【中图分类号】R285.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2025-03-16

# Study on the protective effect of sesquiterpene lactones of *Eupatorium lindleyanum* DC. on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats

*Luo Chen，Yang Yan，Linghu Li，Xia Lian，Zhou Keyun，Liu Chuanxin，Luo Xianqin*
（*College of Traditional Chinese Medicine，Chongqing Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To explore the protective effect of sesquiterpene lactones of *Eupatorium lindleyanum* DC.（SLEL）on lipopolysaccharide（LPS）-induced acute lung injury（ALI）in rats using metabolomics. ***Methods***：Forty-eight male SD rats were randomly divided into a blank control group（CG），a model control group（MG），low-，medium-，and high-dose SLEL groups（50，100，and 200 mg/kg），and a positive control group（dexamethasone acetate tablets，5 mg/kg）. CG and MG groups were given phosphate-buffered saline. All groups received intragastric administration at a dose volume of 10 mL/kg once a day for 7 consecutive days. One hour after the last administration，LPS（5 mg/kg）was instilled into the trachea of all groups except the CG group to establish the ALI rat model. Twenty-four hours after model establishment，blood was collected from the abdominal aorta and bronchoalveolar lavage fluid（BALF）was collected from the left lung. The total number of inflammatory cells，neutrophils，lymphocytes，and eosinophils in BALF was counted by

作者介绍：罗 陈，Email：MorningstarLuo@outlook.com，研究方向：中药药理毒理研究评价。
通信作者：罗先钦，Email：lxq_0203@163.com。
基金项目：重庆市自然科学基金面上资助项目（编号：cstc2021jcyj-msxmX0365）；重庆市教委科学技术研究计划重点资助项目（编号：KJZD-K202215101）；四川省科学技术厅川渝科技创新合作资助项目（编号：2024YFHZ0083）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250509.0922.002（2025-05-12）

Wright-Giemsa staining. The levels of interleukin-18 (IL-18) and interferon-γ (IFN-γ) in serum and BALF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological changes of lung tissue were observed using hematoxylin-eosin staining. The expression levels of tight junction protein-1 (ZO-1) and occludin in lung tissue were determined by Western blot. The mRNA expression levels of IL-18, IFN-γ, ZO-1, and occludin in the lung were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. Non-targeted metabolomics analysis of serum and lung tissue was performed using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. ***Results***: Compared with the MG group, all SLEL groups had significantly reduced wet/dry weight ratio of lung tissue, lung coefficient, and total number of inflammatory cells, neutrophils, lymphocytes, and eosinophils in BALF. SLEL significantly decreased the levels of IL-18 and IFN-γ in serum and BALF and the mRNA expression of IL-18 and IFN-γ in lung tissue, and significantly promoted the protein and mRNA expression of ZO-1 and occludin. Under light microscopy, the degree of lung tissue edema, alveolar hemorrhage, and inflammatory cell infiltration were significantly reduced, indicating a certain protective effect on ALI rats. The results of non-targeted metabolomics studies showed that there were 91 and 33 significantly different metabolites in the serum and lung tissue of rats treated with SLEL, respectively. Among them, the main differential metabolites in the serum were sphingosine, L-lactic acid, nicotinic acid, D-nucleotide, and mevalonate-5P, while the main differential metabolites in the lung tissue were taurocholic acid. This suggests that SLEL may mainly affect the metabolic pathways of sphingolipids, pyruvate, nicotinic acid, nicotinamide, and tryptophan in the serum and the metabolic pathways of taurine and hypotaurine in the lung tissue to improve ALI. ***Conclusion***: SLEL has a significant protective effect on rats against LPS-induced ALI, and its mechanism of action may be related to the inhibition of inflammatory factors, improvement of lung barrier function, and regulation of related metabolic pathways.

**【Key words】**sesquiterpene lactones of *Eupatorium lindleyanum* DC.; acute lung injury; pulmonary barrier; metabolomics

急性肺损伤（acute lung injury，ALI）是指由各种非心源性损伤因素导致的肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤，从而引发弥漫性肺间质和肺泡水肿以及急性低氧性呼吸功能不全或衰竭，是一种严重的呼吸系统疾病[1]。当感染严重或疾病未能及时控制时，会发展为急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）[2]。ALI属于临床常见的危重症，发病急骤、病死率高。虽然目前针对ALI已经开发了多种治疗策略，但临床上可用的治疗方法仍然有限，主要是营养支持、机械通气、病因治疗等综合治疗来提高患者生存率，但患者病死率仍然很高，对公众健康构成严重威胁[3]。因此，探寻新的、更高效的治疗策略，对于ALI的防治及降低其病死率是亟待解决的问题。

野马追倍半萜内酯（sesquiterpenoid lactones of *Eupatorium lindleyanum* DC.，SLEL）是野马追中特征性活性成分，主要包括愈创木烷型、吉马烷型、桉烷型、杜松烷型，其中以吉马烷型和愈创木烷型居多，具有降血脂、预防动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗炎、抗病原微生物等药理作用[4]。有研究表明，野马追醇提取物可以对脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的急性肺损伤大鼠起到保护作用[5]，野马追倍半萜类成分可以减轻小鼠的ALI[6]，但SLEL对ALI的作用及其机制尚不清楚。肺泡上皮细胞屏障完整性对ALI的恢复至关重要紧密连接蛋白-1（zonula occludens-1，ZO-1）和闭合蛋白（Occludin）等紧密连接蛋白的表达降低会加重肺部损伤。非靶向代谢组学能够识别和定量生物样本中的代谢物，从而反映复杂生物体的整体功能。近年来，代谢组学在医学领域的应用日益增多，尤其是在疾病机制的研究方面[7-9]。与代谢组学相结合，研究SLEL对ALI的保护作用具有重要意义。因此，本研究采用非靶向代谢组学结合观察抗炎作用和肺部屏障功能，探讨SLEL对LPS诱导ALI模型大鼠的保护作用及其机制，以期为野马追防治ALI提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 48只180~220 g，6~8周龄雄性SD大鼠，SPF级，购自于重庆医科大学动物实验中心，许可证号：SCXK（渝）2022-0010。饲养温度为24~26 ℃，相对湿度为50%~70%，12 h明暗交替循环，饲养期间自由进食饮水，适应性喂养7 d。本研究已获得重庆医科大学动物伦理委员会批准（伦理编号：IACUC-CQMU-2025-0030）。

1.1.2 药品和试剂 LPS购自于美国Sigma（批号：SMB00610）；醋酸地塞米松片购自于浙江仙琚制药股份有限公司（批号：200923）；白细胞介素-18（interleukin-18，IL-18）、干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）等酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自于厦门嘉慧生物科技有限公司（批号：EHJ-20062r、EHJ-

20040r）；BCA 蛋白检测试剂盒购自于碧云天（批号：P0010）；一抗 ZO-1、Occludin 和 GAPDH 均购自于美国 immunoway 公司（批号：YM8448、YM8316、YM8394）。

1.2 *方法*

1.2.1 分组、模型制备与给药 将 48 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后，随机分为 6 组，即空白对照组（control group，CG）、模型对照组（model group，MG）、SLEL 低、中、高剂量组（low-dose SLEL、medium-dose SLEL、high-dose SLEL，SLEL-L、SLEL-M、SLEL-H，50、100、200 mg/kg）和阳性对照组（醋酸地塞米松片，dexamethasone acetate tablets，DEX，5 mg/kg），其中 CG 组和 MG 组给予磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS），各组灌胃给药体积均 10 mL/kg，每天给药 1 次，连续 7 d。在末次给药后 1 h，除 CG 组外，其余各组大鼠均气管滴注 5 mg/kg LPS 建立 ALI 大鼠模型。造模 24 h 后腹主动脉取血，收集肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），解剖动物并取肺组织，右肺上叶于 4% 多聚甲醛中固定，右肺下叶放进液氮速冻保存。

1.2.2 BALF 的收集 用剪刀及镊子将固定在操作台的平卧位大鼠颈部打开，暴露气管，在环状软骨下结扎，注射器抽取生理盐水 5 mL，缓慢冲洗灌注左肺 2 次，回收 BALF 于 15 mL 无菌离心管内。在 4 ℃条件下，3 000 r/min 离心 10 min，上清即为 BALF，将其保存于 -80 ℃备用。

1.2.3 瑞氏-吉姆萨染色法检测 BALF 中炎性细胞数 将 BALF 离心后的下层沉淀细胞，采用瑞氏-吉姆萨染色法检测 BALF 各炎症细胞数。

1.2.4 肺组织湿/干重比（wet/dry ratio，W/D）的测定 计算大鼠肺系数（肺组织湿重/体质量×100%），称取左肺上叶组织的湿重（W）并记录，烘箱 60 ℃持续烘干 48 h 后精密称取左肺上叶组织干重（D）并记录，计算肺 W/D。

1.2.5 肺组织苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色及病理学变化 取右肺上叶肺组织，置于 5 mL 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h，流水冲洗组织块 30 min 以除残留的多聚甲醛溶液，后将切片依次没于 75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、100% 乙醇Ⅰ、100% 乙醇Ⅱ（低到高），各 5 min 梯度脱水。二甲苯Ⅰ、Ⅱ分别透明 10 min，而后石蜡常规包埋，石蜡切片机按 4～5 μm 标准切片，并将切片贴在黏附载玻片上，60 ℃恒温箱烘干备用。于二甲苯Ⅰ、Ⅱ中分别处理 10 min 以脱蜡，后依次放入 100% 乙醇Ⅰ、100% 乙醇Ⅱ、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇Ⅱ（高到低）以梯度脱水，各 5 min 后将切片放入蒸馏水中，切片没于苏木精水溶液中染色 1 min，并用自来水缓冲 1 min，切片置于碳酸锂中 5 s，自来水缓冲 1 min，伊红染液染色 1 min，乙醇梯度脱水（同前），再次二甲苯透明（同前），中性树胶封片，显微镜观察。对整个肺表面进行炎症和损伤分析，评分如下：正常肺（0 分）、出血（0~1 分）、支气管周围浸润（0~1 分）、肺间质水肿（0~2 分）、肺细胞增生（0~3 分）以及肺泡内浸润（0~3 分）[10]。

1.2.6 ELISA 法检测 血清和 BALF 3 000 r/min，4 ℃离心 10 min，吸取上清，再根据 ELISA 试剂盒的详细操作说明，测定血清及 BALF 中 IL-18 和 IFN-γ 的含量。

1.2.7 Western blot 检测 取大鼠右肺下叶组织，研磨匀浆后，使用蛋白抽提试剂盒提取总蛋白，BCA 法检测组织蛋白浓度。10% SDS-PAGE 凝胶电泳后，将分离蛋白转至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后，磷酸缓冲液（Tris-buffered saline with tween-20，TBST）洗膜，加入 ZO-1，Occludin 一抗（1∶5 000），4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 遍后，加入 HRP 标记的二抗（1∶10 000），室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 遍，ECL 显影液显色。凝胶成像系统成像，Image J 软件计算灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达量。

1.2.8 RT-qPCR 法检测肺组织基因 mRNA 表达 取各组大鼠肺组织，利用 TRIzol 试剂提取总 RNA，采用试剂盒将其逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板，采用两步法进行荧光定量 PCR（反应体系 10 μL），扩增程序为 95 ℃变性 15 s，60 ℃退火/延伸 45 s，共 40 个循环。引物由湖南艾科瑞生物工程有限公司设计并合成，引物序列见表 1。以 GAPDH 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.9 血清和肺组织非靶向代谢组学分析 采用超高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱（ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry，UPLC-ESI-MS/MS）系统（高效液相色谱仪，日本岛津 UFLC CBM30A 系统，京都，日本，www.shimadzu.com.cn/；质谱仪，美国应用生物系统 6500 QTrap，福斯特城，加利福尼亚州，www.applied biosystems.com.cn/）对 CG 组、MG 组和 SLEL-H 组的血清和肺组织进行非靶向代谢物定量分析。分离使用岛津 VP-ODS C18 柱（孔径 5.0 μm，长度 150 mm × 2 mm），柱温为 40 ℃。流动相由溶剂 A（水，0.04% 乙酸）和溶剂 B（乙腈，0.04% 乙酸）组成，流速为 0.4 μL/min。梯度洗脱程序设置如下：0 min 为 100∶0（A∶B，体积比），11.0 min 为 5∶95（A∶B，体积比），12.0 min 为 5∶95（A∶B，体积比），12.1 min 时为 95∶5（A∶B，体积比），15.0 min 为 95∶5（A∶B，体积比）。进样量为 2 μL，柱流出物交替引入 ESI-三重四极杆-线性离子阱（QTRAP）-MS 系统。

**表 1 引物序列**

| 基因 | 正向序列 | 反向序列 |
|---|---|---|
| *IL-18* | CATGCCTGATATCGACCGAAC | AGCCAGTCCTCTTACTTCACT |
| *IFN-γ* | AAGACAACCAGGCCATCAGC | TTTGTGCTGGATCTGTGGGT |
| *ZO-1* | GACCGATTGCTGATGTTGCC | CCAGCATCTCGTGGTTCACT |
| *Occludin* | GAGGCACTGGTCTCTACGTG | CGGTCCATCTTTCTTCGGGT |
| *GAPDH* | GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG | ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA |

### 1.3　统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。2组间比较采用$t$检验，多组间比较采用单因素方差分析。检验水准$\alpha$=0.05。

## 2　结　果

### 2.1　对肺组织病理学改变的影响

实验结果可见LPS诱导的ALI模型动物肺组织的肺湿干重比和肺系数明显升高，肺组织HE染色观察也显示，MG组动物肺组织出现肺水肿加重、肺泡腔内出血、炎症细胞大量浸润，肺泡壁明显增厚，以上变化均表明大鼠肺组织受到严重损伤（$t$=14.370，$P$<0.001）。与MG组相比，SLEL各剂量组均明显降低肺组织的湿干重比（$t$=4.366，$P$=0.001）和肺系数（$t$=5.816，$P$<0.001）；光镜下可见SLEL各剂量组肺组织水肿程度、肺泡腔内出血和炎症细胞浸润明显减轻，提示SLEL对ALI大鼠肺组织损伤具有一定的修复作用（$t$=3.993，$P$<0.001）。结果见图1。

### 2.2　对BALF炎性细胞数的影响

与CG组相比，MG组大鼠BALF中的炎性细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞数目均明显增加（$t$=25.830，$P$<0.001；$t$=23.710，$P$<0.001；$t$=23.910，$P$<0.001；$t$=32.770，$P$<0.001）；与MG组相比，SLEL各剂量组和DEX组能明显降低BALF中的炎性细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞数（$t$=10.350，$P$<0.001；$t$=5.939，$P$<0.001；$t$=11.510，$P$<0.001；$t$=11.120，$P$<0.001），提示SLEL具有一定的抗炎作用。结果见图2。

### 2.3　对血清和BALF中IL-18和IFN-γ含量的影响

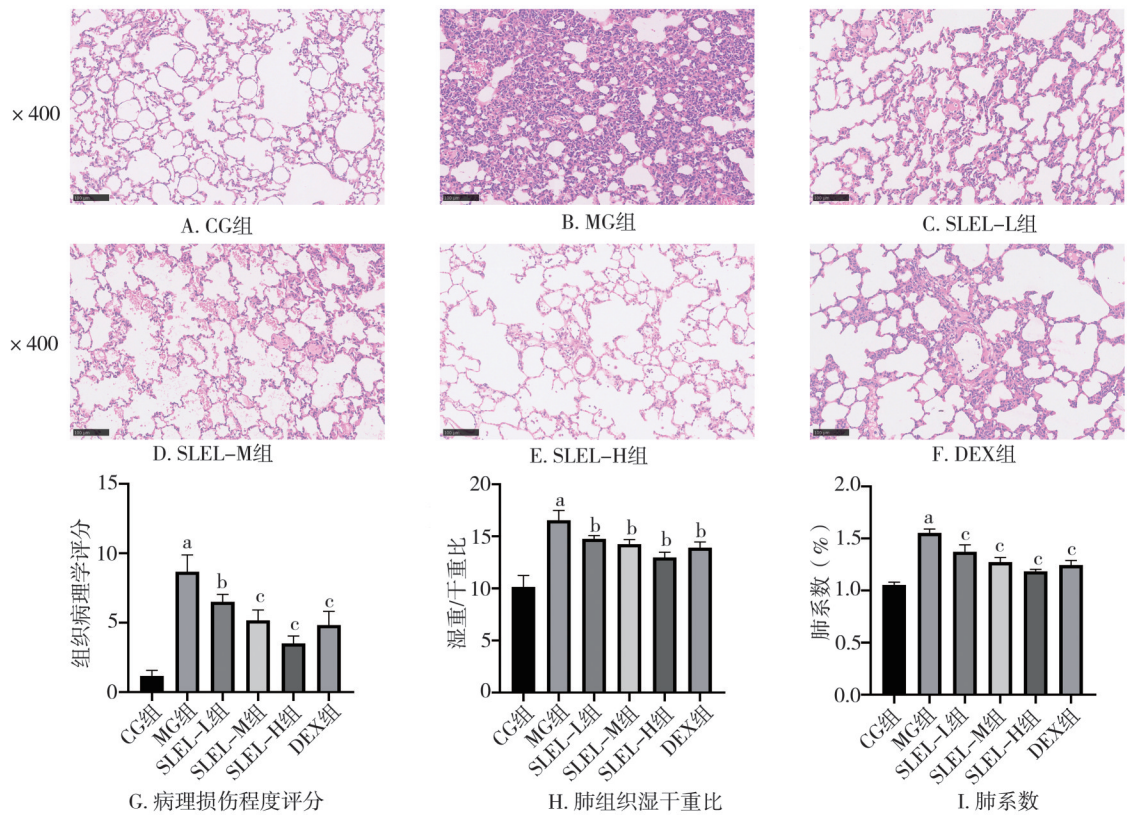
与CG组相比，MG组大鼠血清和BALF中IL-18和IFN-γ的含量均明显升高（$t$=7.469，$P$<0.001；$t$=23.910，$P$<0.001；$t$=14.140，$P$<0.001；$t$=17.210，$P$<0.001）；与MG组相比，SLEL各剂量组能剂量依赖的抑制血清和BALF中IL-18和IFN-γ的分泌水平（$t$=3.784，$P$=0.021；$t$=9.009，$P$<0.001；$t$=4.954，$P$<0.001；$t$=5.780，$P$<0.001），其中SLEL-H的抑制作用优于DEX。提示SLEL能明显抑制炎症因子的分泌而发挥抗炎作用。结果见图3。

### 2.4　对肺组织中ZO-1和Occludin蛋白表达的影响

与CG组相比，MG组肺组织中ZO-1和Occludin的蛋白表达水平明显减低（$t$=6.638，$P$<0.001；$t$=8.150，$P$<0.001）。与MG组相比，SLEL能明显升高大鼠肺组织中ZO-1和Occludin的蛋白表达水平（$t$=7.745，$P$=0.044；$t$=2.554，$P$=0.036），提示SLEL能够改善LPS诱导的肺部屏障功能。结果见图4。

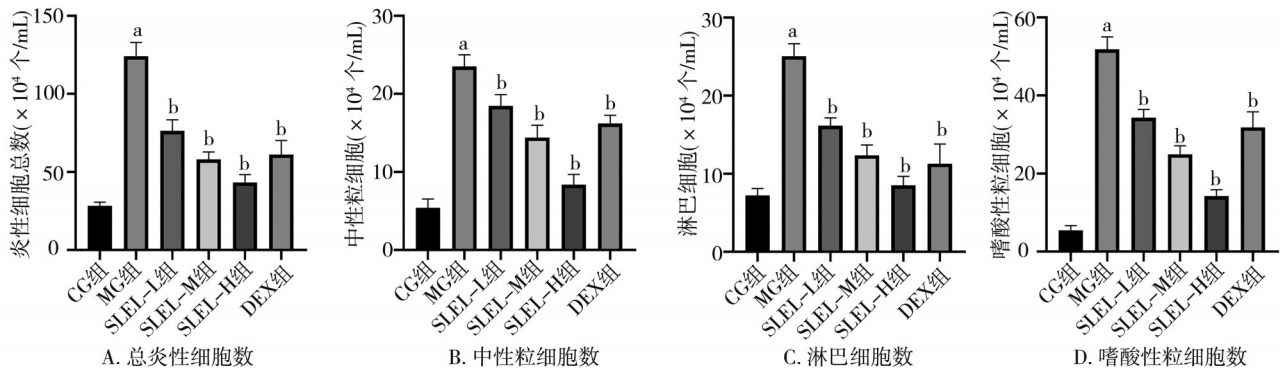
### 2.5　对肺组织IL-18，IFN-γ，ZO-1和Occludin的mRNA表达的影响

与CG组相比，MG组肺组织中IL-18和IFN-γ的mRNA表达水平明显升高（$t$=25.080，$P$<0.001；$t$=20.210，$P$<0.001），而肺组织中ZO-1和Occludin的mRNA表达明显降低（$t$=11.470，$P$<0.001；$t$=19.000，$P$<0.001）。与MG组相比，SLEL



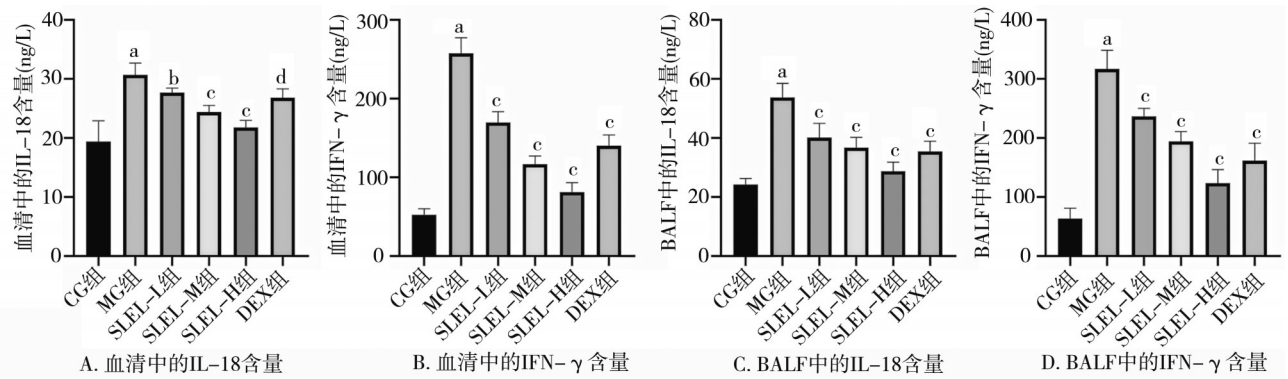

注：a，与CG组相比，$P$<0.001；b，与MG组相比，$P$<0.001；c，与MG组相比，$P$<0.001

**图1　对肺组织病理学改变的影响（HE，×400）**



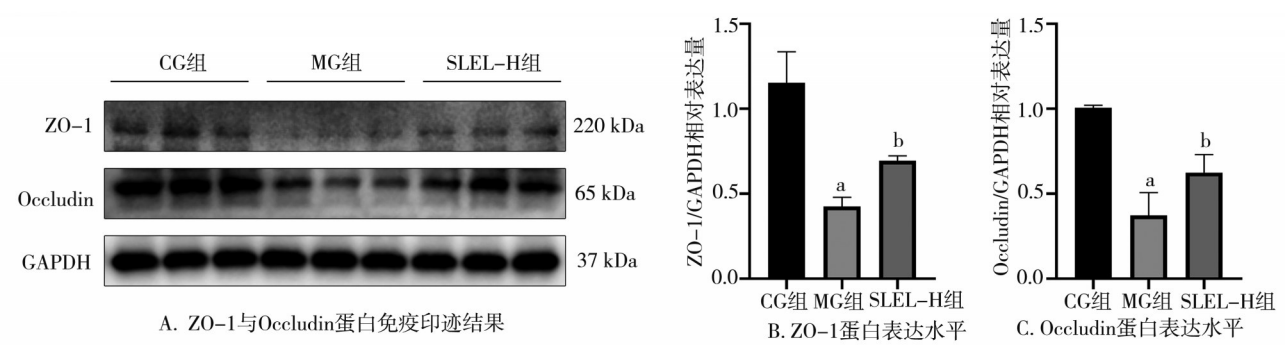

注：a，与CG组相比，$P<0.001$；b，与MG组相比，$P<0.001$

图2　对BALF中炎性细胞数的影响（$\times 10^4$个/mL，$\bar{x}\pm s$）




注：a，与CG组相比，$P<0.001$；b，与MG组相比，$P<0.05$；c，与MG组相比，$P<0.001$；d，与MG组相比，$P<0.01$

图3　对血清和BALF中IL-18和IFN-γ含量的影响




注：a，与CG组相比，$P<0.001$；b，与MG组相比，$P<0.05$

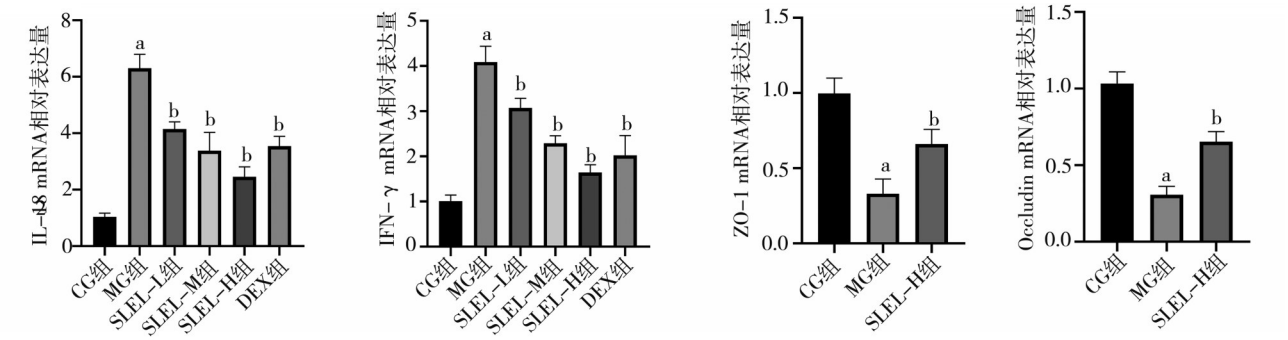
图4　对肺组织中ZO-1和Occludin蛋白表达的影响

各剂量组不仅能剂量依赖地降低肺组织中IL-18和IFN-γ的mRNA相对表达水平（$t$=9.480，$P$<0.001；$t$=6.094，$P$<0.001），其中SLEL高剂量组还能够明显促进肺组织中ZO-1和Occludin的mRNA相对表达水平（$t$=5.809，$P$<0.001；$t$=9.916，$P$<0.001）。结果见图5。

2.6　对血清和肺组织的非靶向代谢组学结果的影响

2.6.1　多元统计分析主成分分析（principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）　在血清样本中，CG组、MG组、SLEL-H组间存在明显分离，血清代谢物亦发生了明显变化，而SLEL能够使其变化趋势回归。第一主成分（principal component 1，PC1）能够解释原始数据集中57.3%的特征，而第二主成分（principal component 2，PC2）能够解释7.8%的特征（图6A）。在肺组织样本中，PC1解释了34.2%的原始数据特征，PC2解释了21%的特征（图6B）。SLEL血清样本（图6C）和肺组织样本（图6E）与MG组相比，PCA分析均存在明显差异。此外，通过OPLS-DA模型可视化分析，SLEL-H组和MG组在血清样本（图6D）及肺组织样本（图6F）也存在明显代谢变化。2种样本的Q2截距均小于0，且回归线斜率为正值，说明原始模型的可靠性较高，不存在过拟合现象，并说明SLEL-H组与MG组的代谢组学差异有统计学意义，且模型能有效区分2组样本。更重要的是，

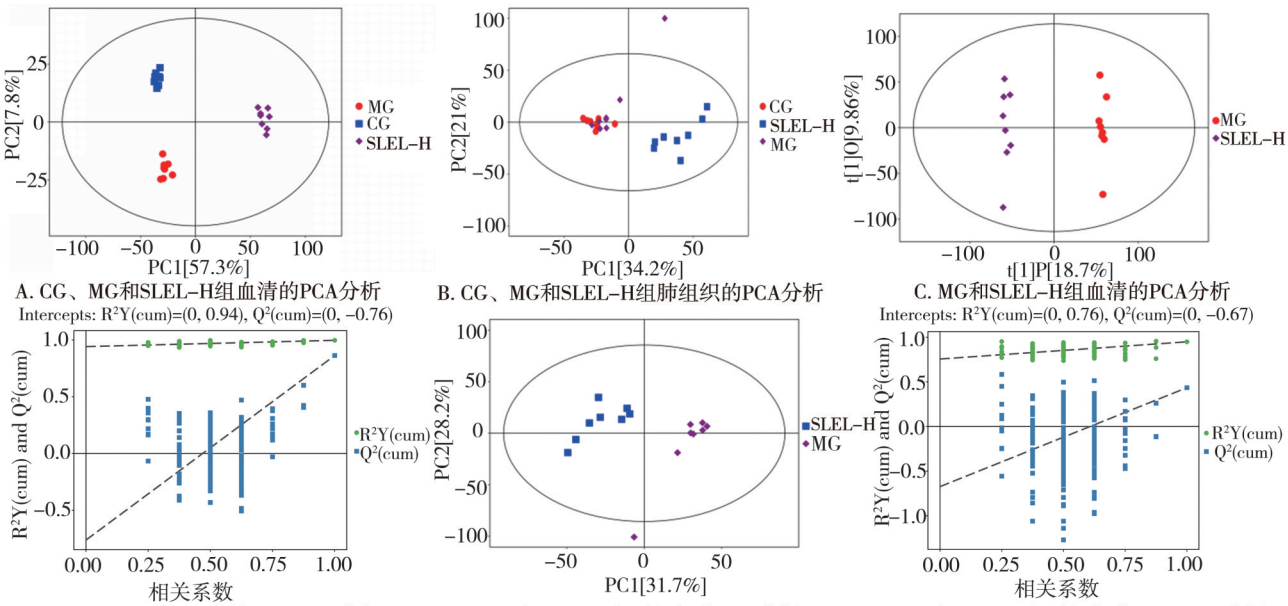
该分析提供了基于变量投影重要性（variable importance in projection，VIP）分析筛选差异代谢物的信息。在代谢物筛选过程中，采用 VIP>1.5 且 $P<0.05$ 作为阈值，以筛选出具有明显差异的潜在代谢物。与 MG 组相比，SLEL-H 组血清样本中共有 91 种代谢物的表达水平发生变化。其中，67 种代谢物水平上调，24 种代谢物水平下调（图 6G）。与 MG 组相比，SLEL-H 组肺组织样本中共有 33 种代谢物的表达水平发生变化。其中，11 种代谢物水平上调，22 种代谢物水平下调（图 6H）。




A. IL-18 mRNA相对水平　B. IFN-γ mRNA相对水平　C. ZO-1 mRNA相对水平　D. Occludin mRNA相对水平

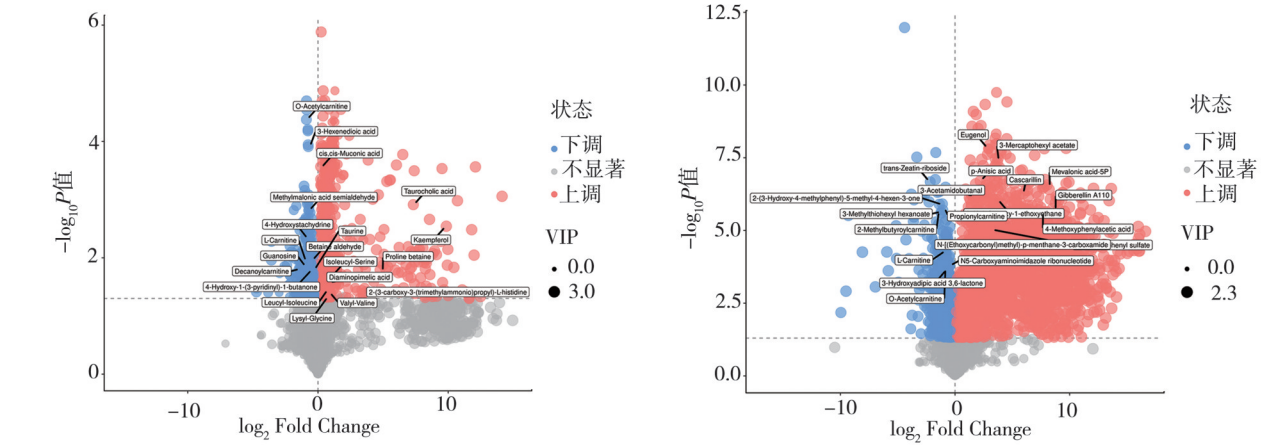
注：a，与 CG 组相比，$P<0.001$；b，与 MG 组相比，$P<0.001$

图 5　对肺组织中 IL-18，IFN-γ，ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 表达的影响




A. CG、MG和SLEL-H组血清的PCA分析　B. CG、MG和SLEL-H组肺组织的PCA分析　C. MG和SLEL-H组血清的PCA分析

D. MG和SLEL-H组血清的OPLS-DA分析　E. MG和SLEL-H组肺组织的PCA分析　F. MG和SLEL-H组肺组织的OPLS-DA分析



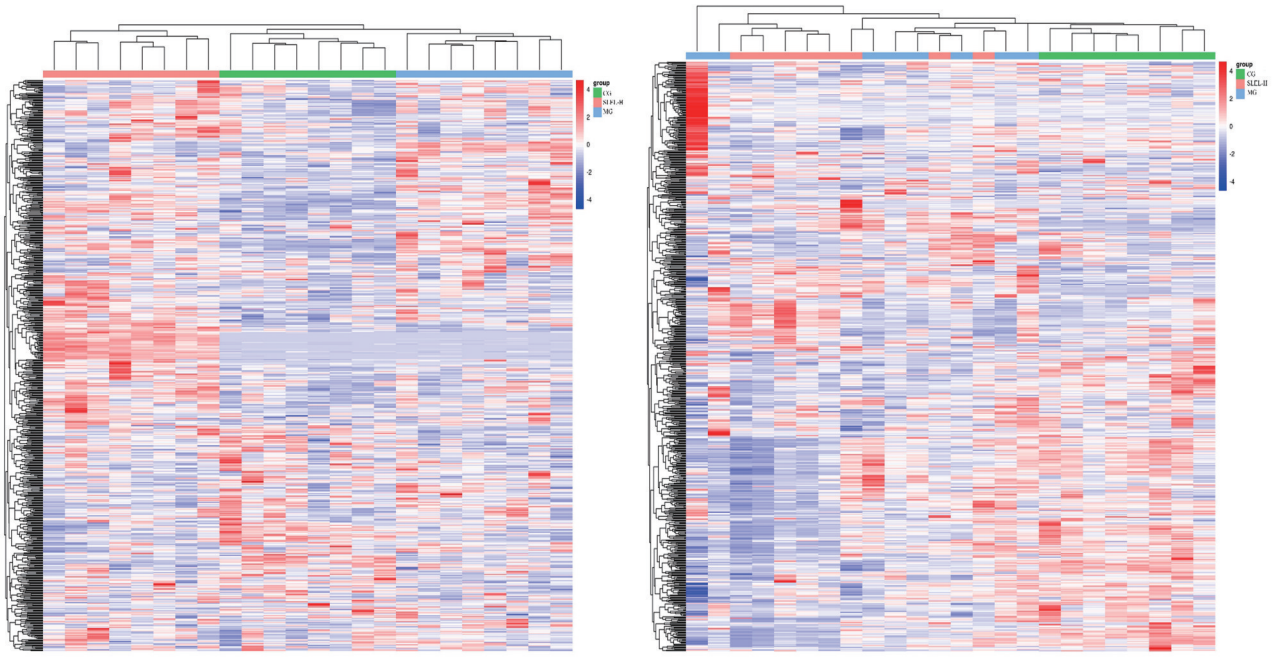

G. MG和SLEL-H组血清的差异代谢物火山图　H. MG和SLEL-H组肺组织的差异代谢物火山图

图 6　血清和肺组织的 PCA 和 OPLS-DA 以及 SLEL-H 组与 MG 组的差异代谢物分析

2.6.2　差异代谢物的层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）　HCA可用于直观展示CG、MG、SLEL-H 3组之间整体代谢物变化趋势。结果显示，CG、MG、SLEL-H组每组样本聚为1类，共聚为3类，表明组内样本具有良好的同质性，组间样本区分度良好，数据可靠性较高。结果见图7。

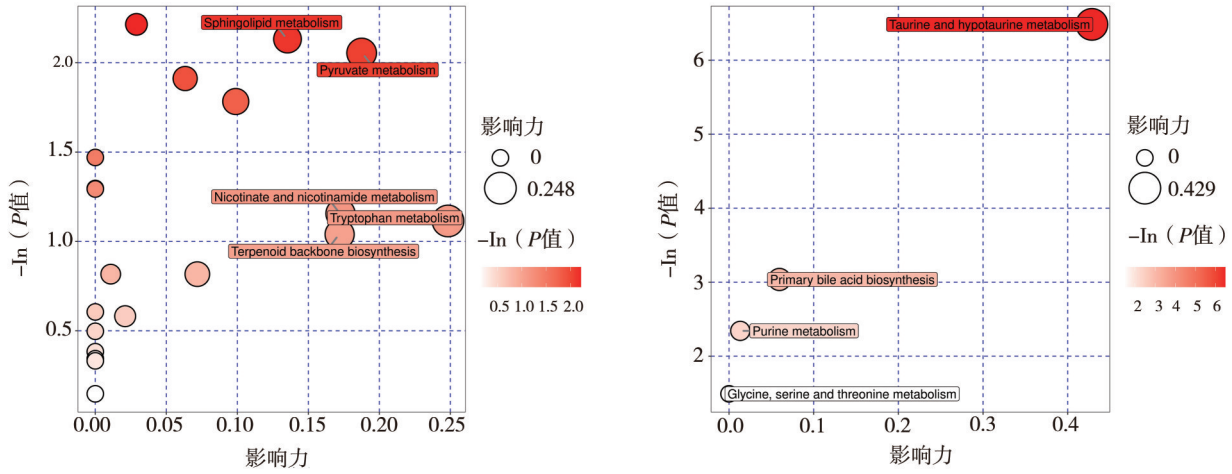
2.6.3　差异代谢物的KEGG注释和富集分析　所获潜在代谢物生物标志物的通路富集显示，SLEL-H组与MG组血清样本中的差异代谢物主要集中在鞘脂、丙酮酸、烟酸和烟酰胺、色氨酸、萜类骨架生物合成等代谢通路。SLEL-H组与MG组肺组织样本中的差异代谢物主要集中在牛磺酸和亚牛磺酸、初级胆汁酸生物合成、嘌呤、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸等代谢通路。结果见图8。

2.6.4　关键差异代谢物的雷达图和ROC曲线分析　基于差异代谢物筛选标准，添加了FC>2或FC<0.5的条件，将符合条件的标志物作为关键差异代谢物。在血清样本的SLEL-H组和MG组中包含55种关键代谢物，在肺组织样本的SLEL-H组和MG组中包含10种关键代谢物。通过文献回顾，从血清中选取了4种主要差异代谢物，即鞘氨醇、L-乳酸、烟酸D-核苷酸、甲羟戊酸-5P，以及从肺组织中选取了一种主要差异代谢物牛磺胆酸，进行ROC分析。如图9所示，AUC均大于0.9，表明差异代谢物具有良好的区分度和高灵敏度。




A. SLEL-H组与MG组血清的聚类热图　　B. SLEL-H组与MG组肺组织的聚类热图

图7　SLEL-H组与MG组血清和肺组织的差异代谢物聚类热图




A. SLEL-H组与MG组血清的差异代谢物KEGG拓扑学分析　　B. SLEL-H组与MG组肺组织的差异代谢组KEGG拓扑学分析

图8　SLEL-H组与MG组血清和肺组织差异代谢物的KEGG拓扑学分析

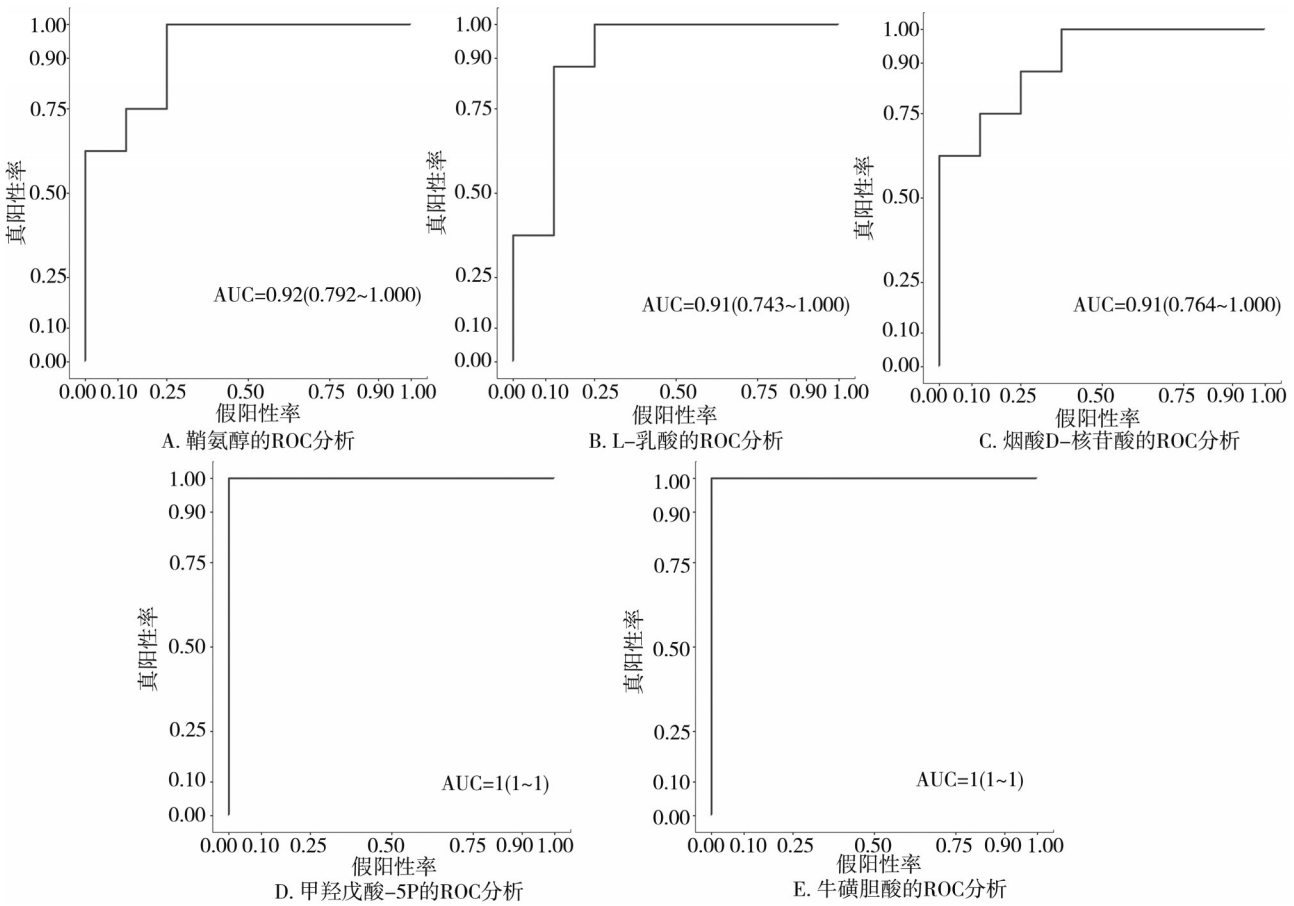



图9 关键差异代谢物的ROC分析

## 3 讨 论

细菌感染、病毒感染、化学性、物理性肺损伤和自身免疫性疾病均有可能导致ALI，其特征是炎症细胞浸润、炎症介质的大量产生和弥漫性肺部炎症，损伤肺组织实质细胞（血管内皮细胞和肺泡上皮细胞）。LPS是造成ALI的重要致病因子，LPS可以激活肺组织中免疫细胞表面模式识别受体分子如Toll样受体（TLR）和NOD样受体，进一步激活下游MAPK激酶和NF-κB信号通路产生炎症因子和炎性介质等，从而导致肺组织损伤。其中IFN-γ是一种关键的促炎因子，可促进巨噬细胞的活化，并进一步释放多种炎症介质，而IL-18则可与IFN-γ协同增强炎症反应[11]。本研究结果表明，SLEL各剂量组均明显降低肺组织的湿干重比、肺系数和BALF的总炎性细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞的数量；均明显降低血清和BALF中IL-18和IFN-γ的含量以及肺组织中IL-18和IFN-γ的mRNA表达；光镜下可见肺组织水肿程度、肺泡腔内出血和炎症细胞浸润明显减轻，提示SLEL对ALI大鼠肺组织具有一定的保护作用。

肺部屏障功能的破坏是ALI的重要病理特征之一，主要表现为肺泡上皮细胞间紧密连接的破坏，导致血管-肺泡屏障通透性增加，从而加重肺水肿和炎症反应。紧密连接蛋白是维持黏膜上皮机械屏障和通透性的重要结构，主要包括ZO-1、Claudin和Occludin等，这些蛋白是维持细胞间连接的关键因子。由于前期量效关系实验已证实SLEL在50~200 mg/kg剂量范围内呈明显剂量依赖性效应，且SLEL-H组（200 mg/kg）效果最为明显，因此本研究未重复检测SLEL-L和SLEL-M组的蛋白与基因表达水平。结果可见，SLEL-H能够明显促进肺组织ZO-1和Occludin的蛋白和mRNA表达，紧密连接蛋白表达的增加提示这有助于维持肺泡上皮细胞的完整性，从而减少肺泡液体渗漏，恢复肺部屏障功能[12]，这进一步说明SLEL对ALI大鼠具有防治作用。

非靶向代谢组学研究结果显示SLEL血清和肺组织分别有91和33种代谢产物差异明显，其中血清中主要差异代谢物为鞘氨醇、L-乳酸、烟酸D-核苷酸及甲羟戊酸-5P，肺组织中主要差异代谢物为牛磺胆酸，提示SLEL可能主要影响血清的鞘脂、丙

酮酸、烟酸和烟酰胺、色氨酸等代谢通路以及肺组织的牛磺酸和亚牛磺酸等代谢通路而改善ALI。鞘氨醇作为鞘脂代谢核心分子，其水平异常可能通过调控S1P受体信号通路影响细胞凋亡与炎症反应[13]，而L-乳酸的明显升高或反映糖酵解增强或线粒体功能障碍，进一步通过“乳酸-$NAD^+$轴”加剧氧化还原失衡，并与烟酸D-核苷酸（$NAD^+$前体）的异常共同指向去乙酰化酶1（sirtuin 1，SIRT1）介导的抗氧化防御系统受损[14-17]。甲羟戊酸-5P的积累则提示胆固醇合成途径（甲羟戊酸途径）异常活化，可能通过脂质过氧化或膜流动性改变加剧组织损伤[18]。肺组织中牛磺胆酸的明显变化可能超越局部代谢调控，其作为肠源性胆汁酸代谢物，或通过“肠-肺轴”交互作用参与全身性炎症应答，例如通过TGR5受体抑制NF-κB通路调控肺部炎症微环境，而这一过程可能与血清中鞘脂/胆固醇代谢紊乱形成跨组织级联效应[19-21]。以上血清和肺组织的代谢物不仅表征能量代谢重编程（糖酵解增强）、氧化应激（SIRT1介导的抗氧化系统受损）与脂质稳态紊乱（鞘脂/胆固醇代谢失调）的互作网络，更通过S1P受体信号通路（凋亡调控）、乳酸-$NAD^+$轴（氧化还原失衡）及肠-肺轴（全身炎症应答）等多环节初步揭示SLEL对ALI保护作用机制提供了新的视角。

SLEL对LPS诱导ALI大鼠具有明显保护作用，其作用机制可能与抑制炎症因子、改善肺部屏障功能以及调控鞘脂、丙酮酸、烟酸和烟酰胺、色氨酸、牛磺酸和亚牛磺酸等代谢通路有关。研究结果不仅为ALI的中药治疗及药物开发提供了实验依据，也对野马追的进一步开发利用具有现实意义。

## 参 考 文 献


[1] Mowery NT, Hillman Terzian WT, Nelson AC. Acute lung injury [J]. Curr Probl Surg, 2020, 57(5): 100777.

[2] Taylor Thompson B, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 562-572.

[3] Dushianthan A, Grocott MW, Postle AD, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury[J]. Postgrad Med J, 2011, 87(1031): 612-622.

[4] Wang XY, Ma SY, Lai FF, et al. Traditional applications, phytochemistry, and pharmacological activities of *Eupatorium lindleyanum* DC.: a comprehensive review[J]. Front Pharmacol, 2020, 8: 577124.

[5] Ren L, Hai Y, Yang X, et al. Yemazhui (Herba Eupatorii Lindleyani) ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury modulation of the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B/nod-like receptor family pyrin domain-containing 3 protein signaling pathway and intestinal flora in rats[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 44(2): 303-314.

[6] Chu CJ, Yao S, Chen JL, et al. *Eupatorium lindleyanum* DC. flavonoids fraction attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39: 23-33.

[7] Antcliffe D, Gordon AC. Metabonomics and intensive care[J]. Crit Care, 2016, 20: 68.

[8] Wang XR, Chen ZH, Li GT, et al. To explore pharmacodynamic substances and mechanism of Xuanfei Baidu Decoction on LPS-induced ALI/ARDS by pharmacochemistry and metabolomics[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 338(Pt 2): 119043.

[9] Zhou JN, Pi N, Guo YQ, et al. The mechanism of action of *Ophiocordyceps* sinensis mycelia for prevention of acute lung injury based on non-targeted serum metabolomics[J]. PLoS One, 2023, 18(6): e0287331.

[10] Chimenti L, Camprubí-Rimblas M, Guillamat-Prats R, et al. Nebulized heparin attenuates pulmonary coagulopathy and inflammation through alveolar macrophages in a rat model of acute lung injury[J]. Thromb Haemost, 2017, 117(11): 2125-2134.

[11] Quagliariello V, Canale ML, Bisceglia I, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor dapagliflozin prevents ejection fraction reduction, reduces myocardial and renal NF-κB expression and systemic pro-inflammatory biomarkers in models of short-term doxorubicin cardiotoxicity[J]. Front Cardiovasc Med, 2024, 11: 1289663.

[12] Zhang Q, Liu YF, Jiang L, et al. Modified Xiao-Qing-Long-decoction prevents inflammation and promotes Nur77 expression in mice with acute respiratory distress syndrome by inhibiting HDAC7 expression[J]. Pharm Biol, 2025, 63(1): 110-117.

[13] Nguyen Van Long F, Valcourt-Gendron D, Caron P, et al. Untargeted metabolomics identifies metabolic dysregulation of sphingolipids associated with aggressive chronic lymphocytic leukaemia and poor survival[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(12): e1442.

[14] He ZY, Yan RQ, Liu JS, et al. Lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase levels associated with the severity of COVID-19: a systematic review and meta-analysis[J]. Exp Ther Med, 2023, 25(5): 221.

[15] Szarpak L, Ruetzler K, Safiejko K, et al. Lactate dehydrogenase level as a COVID-19 severity marker[J]. Am J Emerg Med, 2021, 45: 638-639.

[16] Noh M, Sim JY, Kim J, et al. Particulate matter-induced metabolic recoding of epigenetics in macrophages drives pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Hazard Mater, 2024, 464: 132932.

[17] Conti V, Corbi G, Manzo V, et al. SIRT1 activity in peripheral blood mononuclear cells correlates with altered lung function in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 9391261.

[18] Li MM, Li M, Hou YJ, et al. Ferroptosis triggers airway inflammation in asthma[J]. Ther Adv Respir Dis, 2023, 17: 17534666231208628.

[19] Baliou S, Adamaki M, Ioannou P, et al. Protective role of taurine against oxidative stress (Review)[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2): 605.

[20] Yang Y, He J, Suo Y, et al. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 81: 424-430.

[21] Xie JY, Li H, Zhang XA, et al. *Akkermansia muciniphila* protects mice against an emerging tick-borne viral pathogen[J]. Nat Microbiol, 2023, 8(1): 91-106.


（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

罗 陈，杨 燕，令狐莉，等. 野马追倍半萜内酯对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(7)：889-897.