

灵芝多糖对辐射损伤小鼠影响的胸腺代谢组学分析

迪丽索耶尔·亚勒坤木, 付佳琪, 于栋华*, 于纯森*
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**运用代谢组学方法分析灵芝多糖对辐射损伤小鼠内源性物质代谢的影响,寻找潜在的生物标志物并分析其代谢途径,探讨其作用机制。**方法:**将 30 只小鼠随机分为正常组、模型组和灵芝多糖组(给药剂量 $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 10 只,前两组给予生理盐水,连续灌胃 14 d,在第 7 天灌胃后 2 h,除正常组外,模型组和灵芝多糖组小鼠以 X 射线进行全身照射。利用 UPLC-Q-TOF-MS 检测胸腺组织中内源性小分子代谢物,利用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)比较正常组、模型组以及灵芝多糖组内源性小分子代谢物的变化情况,对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路分析。**结果:**鉴定出 34 个潜在生物标志物,与模型组相比,发现灵芝多糖组对 L-谷氨酸、牛磺酸、磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)等均具有显著的逆转趋势,分别参与牛磺酸和亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢以及 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢。**结论:**灵芝多糖可能通过改善辐射模型小鼠胸腺中相关潜在生物标志物表达及其相关代谢通路来发挥辐射防护作用。

[关键词] 灵芝多糖; 代谢组学; 生物标志物; 辐射防护; 代谢通路; 磷脂酰胆碱; 牛磺酸

[中图分类号] R22;R28;R969.1;Q456;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0102-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191952

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190618.0930.007.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 16:57

Thymic Metabolomics for Effect of Ganoderma Polysaccharides on Radiation-injured Mice

DI Lisoyer · Yale Kunmu, FU Jia-qi, YU Dong-hua*, YU Chun-miao*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Ganoderma polysaccharides (GP) on endogenous substance metabolism in radiation-injured mice by metabolomics, so as to find potential biomarkers and analyze their metabolic pathways, and to explore its mechanism of action. **Method:** Thirty mice were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline) and GP group (dose of $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 14 days of continuous intragastric administration, 10 mice in each group, 2 h after the intragastric administration on the 7th day, mice in the model group and GP group were subjected to whole body irradiation by X-rays, except the normal group. UPLC-Q-TOF-MS was used to detect endogenous small molecule metabolites in thymus tissue of mice. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to compare the changes of endogenous small molecule metabolites in thees three groups, these differential metabolites among the three groups were analyzed by Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) metabolic pathway method. **Result:** A total of 34 potential biomarkers were identified, compared with the model group, it was found that the GP group had a significant reversal trend on L-glutamic acid, taurine, phosphatidylcholine (PC)

[收稿日期] 20190402(021)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(12541745);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13157)

[第一作者] 迪丽索耶尔·亚勒坤木,从事中药活性成分研究,E-mail:979921420@qq.com

[通信作者] *于纯森,博士,副教授,从事中药保健食品的研制与开发,E-mail:miao911@sina.com;

*于栋华,博士,副研究员,从事中药药性理论及药效物质基础研究,E-mail:yudonghua1015@163.com

and lysophosphatidylcholine (LysoPC), etc. They were involved in taurine and hypotaurine metabolism, *D*-glutamine and *D*-glutamate metabolism, glycerophospholipid metabolism. **Conclusion:** GP can play a role in radiation protection by improving the expression of related potential biomarkers and related metabolic pathways in thymus of radiation-injured mice.

[**Key words**] *Ganoderma polysaccharides*; metabolomics; biomarkers; radiation protection; metabolic pathways; phosphatidylcholine; taurine

随着核技术在各领域的应用与日俱增,人们与电离辐射接触的机会日益增多,长时间接触辐射会产生累积损伤,可能会导致机体系统功能发生紊乱,甚至是不可逆损伤^[1]。辐射损伤的自然修复过程十分漫长,因此,研究低毒、安全、有效的辐射防护药物显得极其重要。

灵芝为真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* 或紫芝 *G. sinense* 的干燥子实体,归心、肝、肺、肾经,具有补气安神、止咳平喘的功效^[2]。现代化学研究证明,灵芝含有多种生物活性成分,如多糖类、三萜类、甾醇类、核苷类、生物碱类等^[3]。灵芝多糖是灵芝中一类主要的功效成分,与灵芝的多种药理活性有关,具有提高机体免疫能力、抗肿瘤、抗癌症、抗衰老、调节血脂、抗辐射、提高机体耐缺氧能力等作用^[4]。近年来,关于灵芝多糖功效和机制的分析已成为国内外研究热点。

代谢组学技术通过分析体液和组织中内源性代谢物的变化,研究正常条件下以及疾病和药物影响下机体代谢网络的变化^[5-7]。代谢组学技术应用于电离辐射损伤研究,对于寻找敏感的诊断指标以及损伤机制研究具有潜在的应用前景^[8]。辐射损伤是机体受到电离辐射后引起的一种病理状态,基于辐射损伤会导致一系列代谢产物变化。代谢组学研究部分证实了辐射损伤的经典途径,包括氧化应激和随后的 DNA 分解^[9]。其中很多研究内容基于寻找代谢产物中与辐射剂量相关的生物标志物,以用于辐射损伤早期诊断和预警。

目前研究表明灵芝多糖具有抗辐射损伤的生理作用,但相关机制研究较少^[10-13]。本实验拟建立 X 射线辐射损伤小鼠模型,应用基于 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学方法,测定和分析辐射敏感免疫器官胸腺辐射前后其组织代谢物的变化,发现和确定与辐射作用相关的代谢标志物,根据检测获得的数据分析和探究灵芝多糖发挥辐射防护作用的可能分子机制。

1 材料

ACQUITY™ 型超高液相色谱仪和 LCT Premier

XE 型 Q-TOF 质谱仪(美国 Waters 公司),KDC-160HR 型台式高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),CLINAC21EX 型医用电子直线加速器(美国 Varian 公司),AG135 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

灵芝多糖[陕西慈缘生物技术有限公司,批号 20170809,是真菌赤芝的干燥子实体经提取、纯化干燥、粉碎制得。按 2015 年版《中国药典》(一部)灵芝项下灵芝多糖含量测定方法检测,灵芝多糖质量分数 70.89%],亮氨酸-脑啡肽(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 L9133),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲酸、甲醇为色谱级,其他试剂均为分析纯。

清洁级 Balb/C 小鼠,体质量(20.0 ± 2.0) g,雌雄各半,由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供,许可证号 SCXK(黑)2018-003。小鼠于屏障环境动物室内标准条件下饲养,小鼠适应环境 1 周后开始试验。本文涉及的动物实验经黑龙江中医药大学实验动物使用与管理委员会批准,批准号 2018052325。

2 方法与结果

2.1 动物分组及灌胃剂量 30 只小鼠随机分为 3 组(每组 10 只),即正常组,模型组和灵芝多糖组(剂量 96 mg·kg⁻¹,经折算相当于 2015 年版《中国药典》中记载的人体临床生药有效量 10 g)。灵芝多糖组小鼠灌胃给予灵芝多糖,正常组和模型组给予生理盐水,每天 1 次,给药体积均为 0.02 mL·g⁻¹,连续 14 d。给药 7 d 后 2 h,除正常组外,模型组和灵芝多糖组均以 X 射线进行全身一次性照射(电子直线加速器对小鼠进行 1 次 X 射线全身照射,源皮距 100 cm,剂量率 2.0 J·kg⁻¹·min⁻¹,辐照剂量 5.0 J·kg⁻¹),照射后灵芝多糖组小鼠继续灌胃给予灵芝多糖,正常组和模型组继续给予生理盐水。

2.2 胸腺的采集与制备 于末次给药 24 h 后,取出的新鲜胸腺组织于 4 ℃ 生理盐水中洗去浮血,滤纸吸干水分,剪取胸腺组织,在 1 mL 冰冷的甲醇-生理盐水(1:9)混合液中低温匀浆,于 4 ℃,4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液 100 μL,加入

预冷至 4 ℃ 的甲醇 400 μL, 旋涡混匀 30 s, 室温静置 10 min, 于 4 ℃, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液并转移到微量进样管中, 4 ℃ 冰箱放置待测。

2.3 代谢组学样本分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 进样量 2 μL, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃, 样品仓温度 4 ℃。流动相 0.05% 甲酸乙腈溶液(A)-0.05% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 2% ~ 100% A; 15 ~ 17 min, 100% A; 17 ~ 18 min, 100% ~ 2% A; 18 ~ 20 min, 2% A)。

2.3.2 质谱条件 正离子扫描模式: 电喷雾离子源(ESI), 毛细管电压 1.3 kV, 样本锥孔电压 40 V, 离子源温度 110 ℃, 脱溶剂气温度 350 ℃, 脱溶剂气流量 750 L·h⁻¹, 锥孔气流量 20 L·h⁻¹; 负离子扫描模式: ESI, 毛细管电压 1.5 kV, 样本锥孔电压 70 V, 离子源温度 110 ℃, 脱溶剂气温度 350 ℃, 脱溶剂气流量 750 L·h⁻¹, 锥孔气流量 20 L·h⁻¹。应用 LockSpray™ 校正系统进行亮氨酸脑啡肽在线质量校正, 锁定质量浓度为 1.0 μg·L⁻¹, 流速 30 μL·min⁻¹。数据采集范围 *m/z* 100 ~ 1 500, 采用全扫描方式。

2.3.3 多元数据分析及潜在标志物鉴定 运用 Progenesis QI 软件将每个代谢产物的离子强度进行“归一化”处理, 将获得的数据筛除外源性的成分干扰后导入 EZinfo 2.0 软件, 对各组数据进行非监督型主成分分析(PCA), 进行多维数据的统计分析和降维处理, 采用有监督的正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 将待测样品进行强制分组分析, 以弱化组内差异和个别异常值对分析结果的影响。绘制反映组间离散度的 S-plot 和变量重要性投射(VIP)-plot, 观察代谢物轨迹是否在各自组内相似度较好, 根据得分图筛选特征性代谢产物, 在同一标准下鉴定出具有明显差异性的表达代谢物, 筛选 VIP 值 > 1 且 *P* ≤ 0.05 的离子作为潜在的特征性生物标志物, 通过人类代谢组数据库(HMDB) 和京都基因与基因组百科全书(KEGG) 等数据库, 分析这些生物标志物的生物学意义。

2.4 小鼠造模后的一般表现 正常组小鼠运动灵敏, 毛色光泽, 无松毛、掉毛等现象, 也无死亡情况; 模型组小鼠进食减少, 体质量下降, 毛色枯槁, 易脱落, 精神萎靡, 行动缓慢; 与模型组比较, 灵芝多糖组小鼠毛色和精神状态等方面有所改善。与正常组比较, 模型组小鼠免疫器官胸腺、脾脏产生了显著性

萎缩, 表明造模成功; 灵芝多糖组小鼠的胸腺、脾脏指数明显高于模型组(*P* < 0.05), 表明灵芝多糖能较好地促进免疫器官的恢复。见表 1。

表 1 各组小鼠的胸腺指数与脾脏指数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes of thymus and spleen indexes in mice from each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胸腺指数	脾脏指数
正常	2.375 ± 0.439	2.713 ± 0.574
模型	0.921 ± 0.201 ¹⁾	1.138 ± 0.264 ²⁾
灵芝多糖	1.539 ± 0.388 ³⁾	1.495 ± 0.222 ³⁾

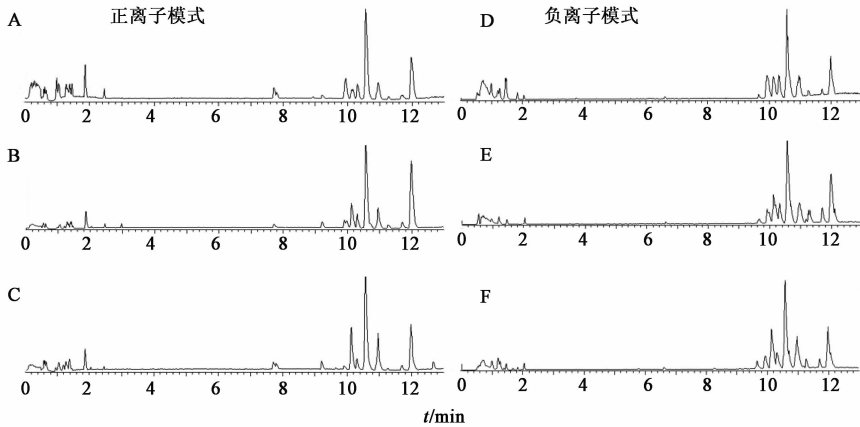
注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与模型组比较³⁾ *P* < 0.05。

2.5 PCA 轮廓分析 由质谱轮廓基峰强度(BPI) 图谱可知, 在正、负离子下各组小鼠胸腺组织代谢轮廓出现明显差异, 见图 1。PCA 得分图结果显示, 在正、负离子模式下, 正常组和模型组样本分布区域基本分开, 没有重叠的情况, 表明小鼠辐射后胸腺代谢产物发生了明显变化, 说明造模成功。灵芝多糖组、模型组与正常组小鼠胸腺代谢轮廓完全分开, 说明各组样本的代谢物存在显著性差异, 且灵芝多糖组处于正常组与模型组之间, 说明其有一定的回调趋势, 见图 2, 3。

2.6 OPLS-DA 轮廓分析 对正、负离子的质谱代谢轮廓进行 OPLS-DA, 获得得分图, 见图 4。结果发现灵芝多糖组与正常组、模型组大致可区分, 基本无交叉或重叠现象, 说明模型拟合效果好; 灵芝多糖组与模型组分开, 且有向正常组靠近的趋势, 说明与模型组的偏离情况相比, 灵芝多糖组已有所改善, 说明灵芝多糖对辐射损伤有明显的恢复效果。在正、负离子模式下的 S-plot 和 VIP-plot 中, 选定 VIP 值 > 1 且 *P* ≤ 0.05 的离子为潜在的生物标志物, 红色为选中的标志物, 即变量高于聚类的平均水平, 见图 4, 结果发现选取的标志物点差异较大。

2.7 生物标志物的鉴定 通过 Progenesis QI 和 HMDB 共鉴定出 34 个潜在生物标志物, 经灵芝多糖干预后与模型组相比存在显著差异性, 提示灵芝多糖的辐射防护作用可能与这些代谢标志物有关, 见表 2。结果发现灵芝多糖可显著上调模型组小鼠胸腺组织中 20 个代谢标志物表达水平, 说明灵芝多糖对小鼠胸腺辐射损伤具有调节作用。

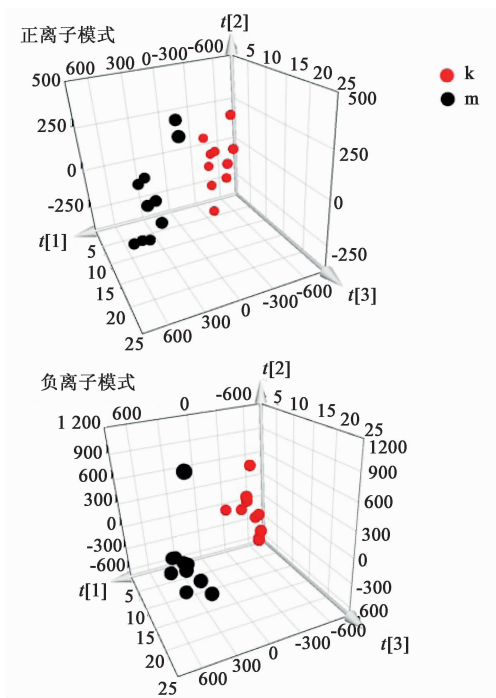
2.8 代谢标志物的生物信息分析 将表 2 中鉴定的 34 个生物标志物输入 HMDB, 得到化学结构、



A, D. 正常组; B, E. 模型组; C, F. 灵芝多糖组

图 1 不同离子模式下各组小鼠胸腺组织的 BPI

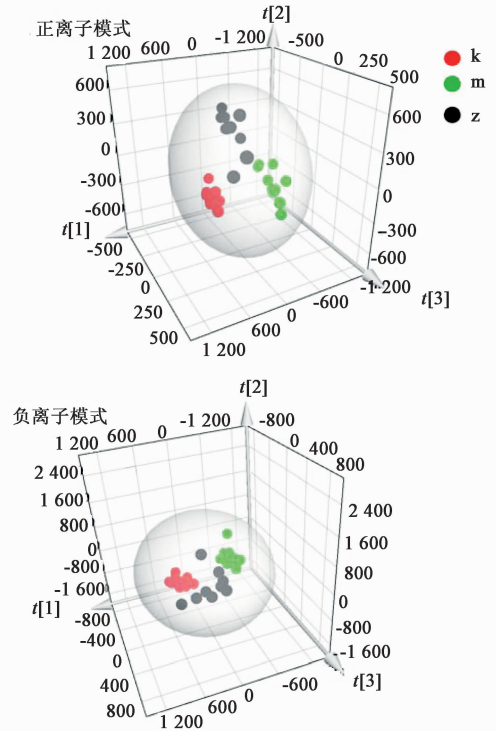
Fig. 1 BPI chromatograms of thymus tissue of mice from each group under different ion modes



k. 正常组; m. 模型组(图 3, 4 同)

图 2 不同离子模式下正常组与模型组小鼠胸腺组织的 3D-PCA

Fig. 2 3D-PCA of thymus tissue of mice from normal group and model group under different ion modes



z. 灵芝多糖组(图 4 同)

图 3 不同离子模式下 3 组小鼠胸腺组织的 3D-PCA

Fig. 3 3D-PCA of thymus tissue of mice from each group under different ion modes

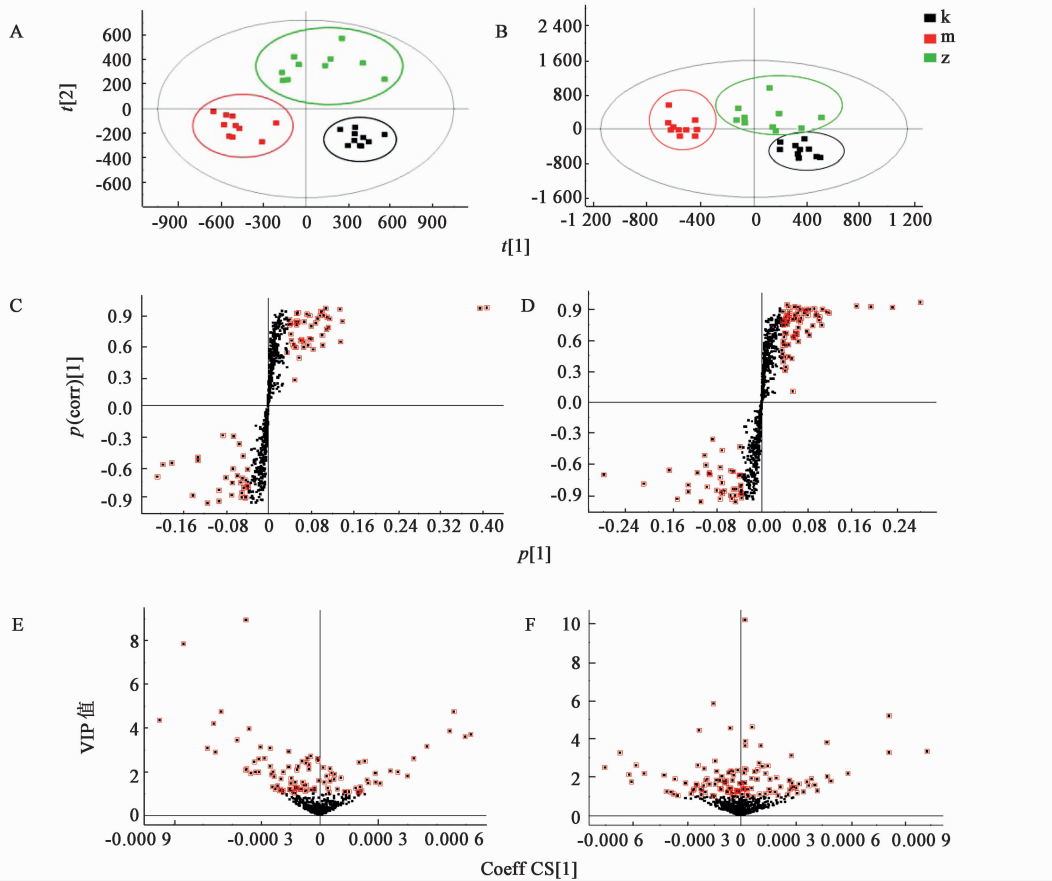
生物功能、细胞位置的信息,见图 5。结果发现化学结构包括脂质、有机酸及其衍生物、有机杂环化合物等;在生物功能中参与了细胞信号、脂肪酸代谢、磷脂/甘油磷酸脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等;在细胞中主要存在于细胞外、细胞膜、细胞质。这些信息提示了标志物可能参与的机体主要生命活动,可推测药物可能的作用机制。

2.9 代谢通路分析 将 34 个潜在生物标志物进行通路显著富集分析,见图 6 和表 3。结果找到潜在

关键代谢通路为牛磺酸和亚牛磺酸代谢, *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢, 甘油磷脂代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。

3 讨论与总结

3.1 牛磺酸和亚牛磺酸代谢 牛磺酸和牛磺胆酸都参与了牛磺酸和亚牛磺酸代谢, 牛磺胆酸经水解生成牛磺酸, 再经半胱氨酸氧化脱羧成亚牛磺酸, 进一步氧化, 参与牛磺酸和亚牛磺酸代谢。牛磺酸是



A. 正离子模式得分图; B. 负离子模式得分图; C. 正离子模式 S-plot 分析(模型组与正常组); D. 负离子模式 S-plot 分析(模型组与正常组); E. 正离子模式 VIP-plot 分析; F. 负离子模式 VIP-plot 分析

图 4 不同离子模式下各组小鼠胸腺组织的 OPLS-DA

Fig. 4 OPLS-DA of thymus tissue of mice form each group under different ion modes

淋巴细胞中含量最高的游离氨基酸,占淋巴细胞中自由氨基酸的 50%。研究表明牛磺酸对细胞的保护作用机制主要是作为过氧化物清除剂,清除细胞内的自由基,从而减轻辐照对机体的损伤作用^[14]。此外,牛磺酸具有提高机体特异性和非特异性免疫功能的作用,缺乏牛磺酸会导致一系列免疫功能障碍。而胸腺作为机体的免疫器官,牛磺酸能不同程度的保护辐照后的淋巴细胞,进而改善辐照对免疫功能的损伤作用^[15]。与正常组比较,牛磺酸在模型组中的表达水平有所下降,推测电离辐射通过抑制牛磺胆酸水解为牛磺酸的水平进而降低牛磺酸的含量,使机体造成免疫损伤;与模型组比较,牛磺酸在灵芝多糖组显著上调,说明灵芝多糖可能通过干预牛磺酸和亚牛磺酸代谢中牛磺酸的合成从而改善机体免疫系统异常。

3.2 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 L-谷氨酸参与了丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢及通路相关性较强的 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢。在胞质中,谷氨

酰胺贡献其 γ (酰胺)氮来合成核苷酸和己糖胺,从而在这个过程中产生谷氨酸。胞质谷氨酸对维持氧化还原反应平衡并通过产生谷胱甘肽来避免细胞出现氧化应激非常关键^[16]。本文研究表明,与空白组相比,模型组 L-谷氨酸的含量显著降低,原因是受辐射损伤后机体处于应激或病理状态下,内源合成的谷氨酰胺大量消耗,对谷氨酰胺的需求量增大,导致谷氨酸合成受到抑制,进而抑制谷胱甘肽含量,使机体中自由基含量增多,免疫功能发生损伤。谷氨酰胺是免疫细胞快速生长和分化细胞的主要能源物质,其水平的变化会使免疫功能发生改变。谷氨酰胺可促进还原性谷胱甘肽的合成来对抗体内的自由基,同时对免疫细胞也有一定的防护作用^[17]。而在本研究中发现,灵芝多糖组与模型组相比,L-谷氨酸含量明显回升,提示灵芝多糖可以减缓辐射对机体造成的损伤,进一步证实灵芝多糖可通过调节 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢中 L-谷氨酸的含量来实现改善辐射损伤。

表 2 灵芝多糖对模型小鼠胸腺组织中内源性代谢产物信息的影响

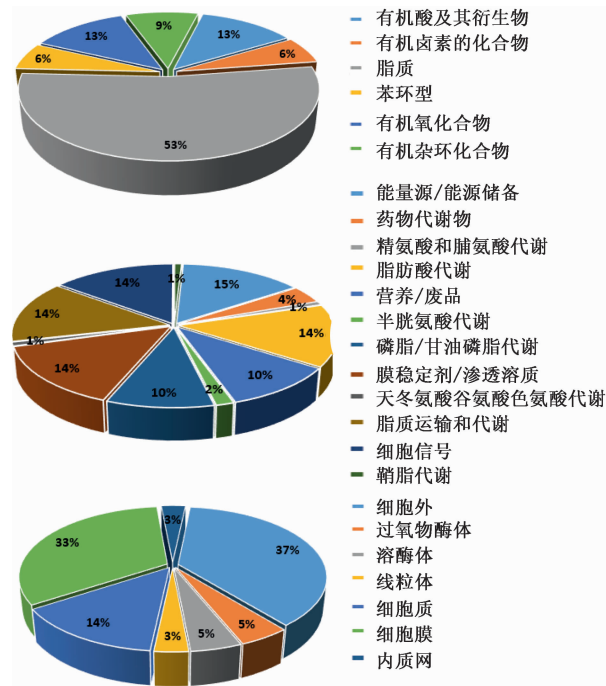
Table 2 Effect of Ganoderma polysaccharides on endogenous metabolites in thymus tissue of model mice

No.	<i>m/z</i>	HMDB ID	ESI 模式	分子式	VIP 值	代谢物	<i>P</i>	趋势
1	124.002	HMDB0000251	+	C ₂ H ₇ NO ₃ S	1.775	牛磺酸 taurine	0.000 553	↑
2	259.010	HMDB0000963	+	C ₆ H ₁₃ O ₇ PS	3.267	5-甲基硫代二糖 1-磷酸 5-methylthioribose 1-phosphate	0.000 241	↑
3	135.024	HMDB0000157	+	C ₅ H ₄ N ₄ O	1.129	次黄嘌呤 hypoxanthine	0.013 067	↑
4	345.236	HMDB0033897	+	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	1.399	银杏酸 ginkgolic acid	0.000 634	↓
5	142.966	HMDB0029571	+	C ₂ H ₄ Cl ₂	1.401	1,2-二氯乙烷 1,2-dichloroethane	0.022 994	↑
6	289.022	HMDB0002127	+	C ₃ H ₆ O ₃ S	1.313	3-巯基乳酸 3-mercaptolactic acid	0.000 013	↑
7	319.219	HMDB0002190	+	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	4.433	5,6-环氧-8,11,14-二十碳三烯酸 5,6-epoxy-8,11,14-eicosatrienoic acid	0.000 016	↓
8	592.360	HMDB0010392	+	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	1.081	溶血磷脂酰胆碱 (LysoPC) [20:2(11Z,14Z)]	0.010 384	↑
9	639.461	HMDB0011136	+	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.058	19-羟化二十碳四烯酸 19(S)-HETE	0.001 170	↑
10	568.361	HMDB0010384	+	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	2.318	LysoPC(18:0)	0.015 544	↓
11	552.366	HMDB0013122	+	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	1.964	LysoPC(P-18:0)	0.000 029	↓
12	585.351	HMDB0000145	+	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	1.839	雌酮 estrone	0.000 742	↑
13	640.289	HMDB0013058	+	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₁₀ S	1.071	S-(9-脱氧 delta9,12-PGD 2)-谷胱甘肽 S-(9-deoxy-delta9,12-PGD2)-glutathione	0.000 444	↓
14	804.559	HMDB0004866	+	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₃	3.791	乳糖神经酰胺 (lactosylceramide) (d18:1/12:0)	0.027 730	↓
15	830.572	HMDB0008071	+	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	2.583	磷脂酰胆碱 (PC) [18:1(11Z)/18:1(9Z)]	0.005 376	↑
16	857.640	HMDB0000712	+	C ₂₃ H ₄₃ NO ₆	1.064	十六烷二酸单-L-肉碱酯 hexadecanedioic acid mono-L-carnitine ester	0.036 869	↓
17	568.587	HMDB0031489	+	C ₃ Cl ₆ O	3.635	1,1,1,3,3,3-六氯-2-丙酮 1,1,1,3,3,3-hexachloro-2-propanone	0.000 399	↓
18	146.037	HMDB0000148	+	C ₅ H ₉ NO ₄	1.431	L-谷氨酸 L-glutamic acid	0.000 976	↑
19	175.013	HMDB0014684	+	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂	1.231	氟尿嘧啶 fluorouracil	0.022 132	↑
20	356.991	HMDB0004812	+	C ₆ H ₄ O ₅	1.382	2,5-呋喃二甲酸 2,5-furandicarboxylic acid	0.004 064	↓
21	306.066	HMDB0028752	+	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₇	1.039	天冬氨酰谷氨酸 aspartyl-glutamate	0.001 968	↑
22	353.226	HMDB0014968	+	C ₁₁ H ₁₅ NO	1.565	苯甲吗啉 phenmetrazine	0.005 743	↑
23	538.314	HMDB0010383	+	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	1.326	LysoPC[16:1(9Z)]	0.012 099	↓
24	566.345	HMDB0002815	+	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	1.646	LysoPC[18:1(9Z)]	0.007 453	↓
25	528.308	HMDB0000722	+	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	1.827	石胆酰牛磺酸 lithocholyltaurine	0.020 157	↑
26	204.125	HMDB0012215	-	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O	1.357	二氢玉米素 dihydrozeatin	0.000 303	↑
27	813.668	HMDB0012107	-	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	5.459	鞘磷脂 (SM) [d18:1/24:1(15Z)]	0.006 698	↑
28	190.051	HMDB0000978	-	C ₁₀ H ₉ NO ₄	1.016	4-(2-氨基苯基)-2,4-二氧代丁酸 4-(2-aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid	0.000 173	↓
29	279.162	HMDB0013248	-	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1.868	单乙基己基邻苯二甲酸 monoethylhexyl phthalic acid	0.000 003	↑
30	438.300	HMDB0032797	-	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	1.259	茉莉酸 jasmonic acid	0.023 863	↑
31	482.359	HMDB0036688	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1.521	木香烯内酯 costunolide	0.000 017	↑
32	546.356	HMDB0010393	-	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	1.710	LysoPC[20:3(5Z,8Z,11Z)]	0.000 211	↓
33	497.241	HMDB0035626	-	C ₂₅ H ₃₆ O ₁₀	1.880	格劳卡苷 glaucarubin	0.009 469	↓
34	760.584	HMDB0007879	-	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	3.094	PC[14:0/20:1(11Z)]	0.034 566	↑

注:灵芝多糖组与模型组比较↑.上调;↓.下调。

3.3 甘油磷脂代谢 PC[18:1(11Z)/18:1(9Z)] 和 PC[14:0/20:1(11Z)] 是磷脂酰胆碱,主要参与甘油磷脂代谢,还参与花生四烯酸代谢、亚油酸代谢和 α-亚麻酸代谢,由胆碱途径、乙醇胺途径和磷脂

酰丝氨酸(PS)途径 3 种途径合成^[18]。磷脂酰胆碱具有极性和非极性部分,从而插入自身细胞膜,防止脂质过氧化,抑制脂质二硫键的断裂,防止细胞被破坏凋亡^[19-20],保持其细胞的完整性。与模型组



A. 化学结构; B. 生物功能; C. 细胞位置

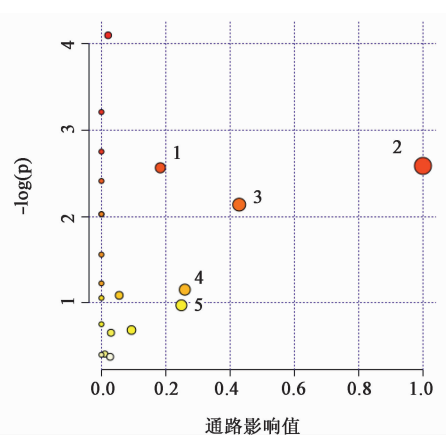
图 5 灵芝多糖对模型小鼠干预的潜在生物标志物分类

Fig. 5 Classification of potential biomarkers for intervention of Ganoderma polysaccharides on model mice

表 3 灵芝多糖对辐射损伤小鼠胸腺组织中潜在生物标志物的代谢通路

Table 3 Metabolic pathways of Ganoderma polysaccharides on potential biomarkers in thymus tissue of radiation-injured mice

通路	化合物 总数/个	通路 期望值	匹配数 /个	原始 P	通路 影响值
花生四烯酸代谢 arachidonic acid metabolism	36	0.56	3	0.016 6	0.02
鞘脂代谢 sphingolipid metabolism	21	0.33	2	0.040 4	0
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 cysteine and methionine metabolism	27	0.42	2	0.063 9	0
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 D-Glutamine and D-glutamate metabolism	5	0.08	1	0.075 3	1.00
甘油磷脂代谢 glycerophospholipid metabolism	30	0.47	2	0.077 0	0.18
亚油酸代谢 linoleic acid metabolism	6	0.09	1	0.089 8	0
牛磺酸和亚牛磺酸代谢 taurine and hypotaurine metabolism	8	0.12	1	0.117 9	0.43
α-亚麻酸代谢 α-linolenic acid metabolism	9	0.14	1	0.131 7	0
氮代谢 nitrogen metabolism	9	0.14	1	0.131 7	0
组氨酸代谢 histidine metabolism	15	0.23	1	0.210 1	0
丁酸代谢 butanoate metabolism	22	0.34	1	0.293 1	0
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	0.37	1	0.315 2	0.26
谷胱甘肽代谢 glutathione metabolism	26	0.40	1	0.336 7	0.06
卟啉和叶绿素代谢 porphyrin and chlorophyll metabolism	27	0.42	1	0.347 1	0
药物代谢-其他酶 drug metabolism-other enzymes	30	0.47	1	0.377 7	0.25
色氨酸代谢 trptophan metabolism	40	0.62	1	0.469 9	0
精氨酸和脯氨酸代谢 arginine and proline metabolism	44	0.68	1	0.503 0	0.09
原发性胆汁酸生物合成 primary bile acid biosynthesis	46	0.71	1	0.518 8	0.03
嘌呤代谢 purine metabolism	68	1.06	1	0.663 9	0.01
氨酰基-tRNA 生物合成 aminoacyl-tRNA biosynthesis	69	1.07	1	0.669 3	0
类固醇激素生物合成 steroid hormone biosynthesis	72	1.12	1	0.685 3	0.03



1. 甘油磷脂代谢; 2. D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢; 3. 牛磺酸和亚牛磺酸代谢; 4. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 5. 药物代谢-其他酶
图 6 灵芝多糖对辐射损伤小鼠胸腺组织中潜在生物标志物的拓扑分析

Fig. 6 Topological analysis of Ganoderma polysaccharides on potential biomarkers in thymus tissue of radiation-injured mice

相比,灵芝多糖组的 PC[18:1(11Z)/18:1(9Z)] 和 PC[14:0/20:1(11Z)] 显著上调,推测通过上调磷脂酰胆碱来抑制电离射线造成的细胞损伤,保存细胞的完整性,有利于对电离辐射损伤的防护。

LysoPC(P-18:0), LysoPC(18:0), LysoPC[20:2(11Z,14Z)], LysoPC[18:1(9Z)], LysoPC[20:3

(5Z,8Z,11Z)], LysoPC[16:1(9Z)]都参与甘油磷脂代谢,是单甘油磷脂,一般称为溶血磷脂酰胆碱,溶血磷脂酰胆碱是通过磷脂酶 A2 水解磷脂酰胆碱形成的,具有较强的表面活性剂,溶血磷脂酰胆碱含量过高,可以使组织细胞发生溶血或坏死,使机体造成损伤,免疫系统功能发生紊乱。与正常组比较,模型组中 LysoPC(P-18:0), LysoPC(18:0), LysoPC[18:1(9Z)], LysoPC[20:3(5Z,8Z,11Z)], LysoPC[16:1(9Z)]均上调,给予灵芝多糖后其表达水平显著下调,与正常组接近。推测通过抑制磷脂酶 A2 水解磷脂酰胆碱达到小鼠抗电离辐射的作用,说明灵芝多糖对细胞溶血及坏死有一定的保护作用。

3.4 总结 辐射损伤的发生以脂类代谢、氨基酸代谢及能量代谢的紊乱为主,其中牛磺酸和亚牛磺酸代谢, D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,甘油磷脂代谢相关性最强,使整个机体机能处于一种失衡状态。本研究结果表明内源性代谢物的变化不仅能反映出辐射损伤小鼠体内发生的生理变化,而且能在一定程度上反映灵芝多糖干预后出现的明显回调情况,这一结果与灵芝多糖能够改善胸腺免疫组织状态、减轻辐射损伤效果一致。这些结果提示灵芝多糖抗电离辐射的作用可通过胸腺中多个代谢物靶点的干预来实现,也再次证实代谢组学技术能从整体上解释机体应激状态或揭示机体接受治疗后表现出的生物学特征,更加全面了解机体辐射后的代谢过程和代谢产物,可为辐射损伤的诊断以及辐射防护药物的研制提供实验依据。但是辐射代谢组学的研究还主要集中在动物和细胞水平,随着研究的深入及新技术的出现,可以预测代谢组学技术将在辐射损伤的机制及其防治药物研究中发挥更大作用。

[参考文献]

[1] Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, et al. Long-term effects of radiation exposure on health [J]. Lancet, 2015, 386 (9992):469-478.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:188-189.
[3] 程纯儒,丁杰,杨义,等. 近年来灵芝属化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(12):128-134.
[4] 张瑞婷,周涛,宋潇潇,等. 灵芝活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(3):18-19,22.
[5] HAN J, QIN W X, LI Z L, et al. Tissue and serum metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma [J]. Clin Chim Acta, 2019,488:68-75.

[6] 王高玉,刘红宁,戈淑超,等. 铁皮石斛水提物对胃癌前病变作用的尿液代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(21):77-85.
[7] Dubey D, Kumar S, Chaurasia S, et al. NMR-based serum metabolomics revealed distinctive metabolic patterns in reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis[J]. J Proteome Res,2019,18(1):130-146.
[8] 郭明星,吴诚,童卫杭. 代谢组学在辐射损伤研究中的应用[J]. 解放军医药杂志,2015,27(12):113-116.
[9] MU H, SUN J, LI L, et al. Ionizing radiation exposure: hazards, prevention, and biomarker screening [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25 (16):15294-15306.
[10] 陈建济,张瑜,王秀敏,等. 灵芝多糖的药效学研究 II. 防辐射及升高白细胞的作用[J]. 海峡药学,2000,12(4):15-17.
[11] Pillai T G, Nair C K, Janardhanan K K. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in southern parts of India, protects radiationinduced damages both *in vitro* and *in vivo* [J]. Environ Toxicol Pharmacol,2008,26(1):80-85.
[12] ZHAO W, JIANG X, DENG W, et al. Antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their role on DNA damage in mice induced by cobalt-60 gamma-irradiation [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (2):303-309.
[13] 丁妍,周向毅,崔莉,等. 灵芝多糖对辐射损伤小鼠的防护作用[J]. 医学研究生学报,2014,27(11):1152-1155.
[14] 郝洪,王卫娜. 牛磺酸、维生素对高同型半胱氨酸血症兔动脉粥样硬化的干预研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):227-229.
[15] 郭杰,王蓓,戎瑞雪,等. 牛磺酸对顺铂所致 H22 荷瘤小鼠免疫器官及淋巴细胞损伤的保护作用[J]. 食品科学,2015,36(5):200-204.
[16] Hensley C T, Wasti A T, DeBerardinis R J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (9):3678-3684.
[17] Albanese C, Machado F S, Tanowitz H B. Glutamine and the tumor microenvironment [J]. Cancer Biol Ther, 2011,12(12):1098-1100.
[18] van der Veen J N, Kennelly J P, WAN S, et al. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017, 1859(9Pt B):1558-1572.
[19] Colares J, Schemitt E, Hartmann R M, et al. Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid [J]. J Coloproctol, 2016,36(2):97-103.
[20] 陈瑞,马宁宁,范珊珊,等. 基于代谢组学分析金芪降糖片改善 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(20):102-107.

[责任编辑 刘德文]