

·基础研究·

本文引用:钟森杰,李欣春,李杰,胡志希,简维雄,周瑶,姚涛,杨梦.心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):981-985.

心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学研究

钟森杰¹,李欣春²,李杰¹,胡志希^{1*},简维雄^{1*},周瑶¹,姚涛¹,杨梦¹
(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.长沙金润中医院,湖南长沙410014)

[摘要] **目的** 研究心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学特征。**方法** 将Dahl盐敏感性大鼠分为模型组和正常组,通过高盐饲料喂养模型组大鼠的方法制造心衰模型,于成模后采集模型组(7只)和正常组(8只)大鼠的血浆样本,运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术及多元统计分析进行模式识别和差异代谢物的筛选。**结果** 主成分分析和偏最小二乘判别分析后得到的得分图显示两组血浆样本的代谢成分积分点完全分离,表明两组大鼠的代谢模式存在明显差异,正交-偏最小二乘判别分析发现,与正常组比较,模型组苏糖酸、半胱氨酸、鸟氨酸、丙氨酸、4-羟基-脯氨酸、苏氨酸、甲基半胱氨酸、天冬酰胺、花生四烯酸、胆固醇、蔗糖醇、丙酮酸、焦谷氨酸浓度上升;色氨酸、亮氨酸、木糖醇、核糖醇、丙二酸、尿素浓度下降。**结论** 心气阴两虚证心衰大鼠模型血浆代谢组学出现变化,差异代谢物与氨基酸代谢、脂代谢、糖代谢紊乱和肝功能异常相关。

[关键词] 心力衰竭;心气阴两虚证;代谢组学

[中图分类号]R541;R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.003

Plasma Metabonomics of Rats with Heart Failure with Heart-Qi Yin Deficiency Syndrome

ZHONG Senjie¹, LI Xinchun², LI Jie¹, HU Zhixi^{1*}, JIAN Weixiong^{1*}, ZHOU Yao¹, YAO Tao¹, YANG Meng¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Jin-Run Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the features of plasma metabonomics in rats with heart failure with heart-Qi Yin deficiency syndrome. **Methods** Dahl salt-sensitive rats were divided into model group and normal group. The rats in the model group were given high-salt fodder to establish a model of heart failure. After modeling, plasma samples were collected from 7 rats in the model group and 8 in the normal group, and gas chromatography-mass spectroscopy and a multivariate statistical analysis were performed for analysis. **Results** The score chart obtained by principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis showed that the integral point of metabolic components was completely separated between the two groups, indicating that there was a significant difference in metabolic pattern between the two groups. The orthogonal partial least squares-discriminant analysis of the variables with between-group differences showed that compared with the normal group, the model group had significant increases in the concentrations of threonic acid, cysteine, ornithine, alanine, 4-hydroxy-proline, threonine, methyl cysteine, asparagine, arachidonic acid, cholesterol, D-threitol, pyruvic acid, and pyroglutamic acid and significant reductions in the concentrations of tryptophan, leucine, xylitol, ribitol, malonic acid, and carbamide. **Conclusion** There are changes in the plasma metabonomics of rats with heart failure, and differential metabolites are associated with disorders of amino acid metabolism, lipid metabolism, and glucose metabolism and abnormal liver function.

[Keywords] heart failure; heart-Qi Yin deficiency syndrome; metabonomics

[收稿日期]2018-03-08

[基金项目]国家自然科学基金项目(81774208,81774207,81373550)。

[作者简介]钟森杰,男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律。

[通讯作者]* 胡志希,男,教授,博士研究生导师,E-mail:515800272@qq.com;* 简维雄,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:86461822@qq.com。

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学后新兴的研究方法,通过现代分析技术(液相色谱-质谱、气相色谱-质谱、核磁共振等)定量测定生物体内的内源性代谢产物,结合模式识别等化学信息学技术考察生物体在不同状态下代谢产物的变化,从而寻找代谢物与病理生理之间的联系^[1],其具有整体性和系统性的特点,与中医学的整体观念相契合,因此可作为中医证候研究的出发点和切入点^[2]。本研究运用基于气相色谱-质谱(GC-MS)联用的代谢组学技术对心气阴两虚证心衰大鼠的血浆代谢物进行研究,探讨其代谢组学变化规律,进一步揭示证候的生物物质基础,为心衰的诊断、辨证和治疗提供新思路。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Dahl 盐敏感性大鼠 15 只,体质量(220±10)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证编号:11400700134072,分笼饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室内。

1.2 主要试剂

甲醇(上海沃凯公司);2-氯苯丙氨酸(美国 Aladdin 公司)、十七碳酸(美国 Aladdin 公司);甲氧基胺盐酸盐、吡啶、BSTFA 衍生化试剂(日本 TCI 公司)。

1.3 主要仪器

7890A 型气相色谱仪、5975C 型质谱仪(美国 Agilent 公司);超低温冰箱 Forma 900series(美国 Thermo 公司);H1650-W 型冷冻离心机、53050 型真空浓缩仪(德国 Eppendorf 公司);DHG-9240 型鼓风干燥箱(上海一恒公司);KW-100TDV 型超声波清洗器(昆山舒美公司)。

2 方法

2.1 模型制备

本课题组通过 8%NaCl 高盐饲料喂养 Dahl 盐敏感性大鼠 20 周,建立高血压心衰大鼠模型;同时以 0.3%NaCl 低盐饲料喂养 Dahl 盐敏感性大鼠作为正常大鼠模型。本次实验选取前期制备的高血压心衰大鼠(7 只)和正常大鼠(8 只),进行血浆代谢组学研究^[3]。

2.2 心气阴两虚证模型评价

本课题组前期研究发现参麦注射液对高血压

心衰大鼠的治疗效果显著,而参附注射液对高血压心衰大鼠无治疗效果,基于“以方测证”理论验证了高血压心衰大鼠所属证型为心气阴两虚证^[4]。

本次研究观察了模型大鼠的体征及行为情况,参考中国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会于 1986 年修订的《中医虚证辨证参考标准》,通过以下表现情况进行评价:心率增快反映心悸症状,呼吸急促反映气短症状,精神萎靡、蜷缩懒动反映神疲乏力、少气懒言症状,抓起反抗剧烈反映烦躁易怒症状。发现该模型大鼠能较好地反映心气阴两虚证的相关证候特点,与“以方测证”结果相符合,认为该模型能作为心气阴两虚证动物模型进行研究。

2.3 血浆样本采集与处理

两组大鼠血浆采集前 12 h 禁食不禁水,以 4 mL/kg 腹腔注射 10%水合氯醛麻醉大鼠,随后进行腹主动脉取血,采血完毕后常温静置 20 min,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 保存。

实验前预处理:(1)在每个血浆样本中加入 60 μL 的 2-氯苯丙氨酸以及 60 μL 十七碳酸作为内标,涡旋振荡 30 s;(2)放入超声波机室温处理 30 min,冰上放置 30 min;(3)4 °C 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 200 μL,转移至 1.5 mL 离心管中,用真空离心浓缩仪浓缩;(4)加入 60 μL 甲氧基溶液涡旋振荡 30 s,37 °C 条件下反应 2 h;(5)加入 60 μL BSTFA 衍生化试剂(含 1%三甲基氯硅烷),37 °C 条件下反应 90 min,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入检测瓶中,进行 GC-MS 上机分析。

2.4 数据预处理

通过 Agilent MSD ChemStation 工作站将 GC-MS 分析得到的原始数据转换成 netCDF 格式(xcms 输入文件格式),运用 R(v3.1.3)的 XCMS 程序包进行峰识别、过滤和对齐,得到包括质核比、保留时间和峰面积等信息的数据矩阵。随后结合色谱-质谱自动处理与鉴定系统(AMDIS)程序进行代谢物的注释,将注释到的代谢物进行分类,分别为氨基酸、糖类、核苷酸、有机酸、脂肪酸、磷酸、胺类、多元醇以及其他等九大类,所用数据库为 Wiley Registry 代谢组数据库。

2.5 统计学分析

运用 SIMCA-P(v13.0)软件包对所得数据进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA),以得分图的形式显示结果。随后进行正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),选取 OPLS-DA 模型第一主成分 VIP 值>1 的代谢物作为对分类有重要贡献的变量,结合单因素方差分析结果寻找差异代谢物。

3 结果

3.1 GC-MS 分析结果

GC-MS 分析后,得到两组样本的代表性总离子流色谱图(TIC),见图 1。结合 Wiley Registry 代谢组数据库选择出匹配度较好的化合物共 85 种,其中氨基酸类 24 种、有机酸类 24 种、多元醇类 9 种、脂肪酸类 6 种、糖类 6 种、磷酸类 2 种、胺类 2 种和其他类别 12 种。

3.2 模式识别分析结果

PCA 得分图可以观察样本的聚集、离散程度,

样本点越远离,说明这些样本中所含代谢物的组成和浓度差异越大;PLS-DA 得分图可直观地展示模型分类效果,两组样本的分离程度越大,说明分类效果越显著。如图 2 所示,PCA 得分图显示样本点基本都处于椭圆形散点图(95%置信区间)内,模型组和正常组的样本点在空间分布上明显分开,无交叉和重叠;PLS-DA 得分图显示样本点基本都处于椭圆形散点图内,模型组和正常组之间沿 t1 轴线方向分离,分离程度较好,无交叉和重叠。上述结果表明模型组大鼠和正常组大鼠的代谢模式存在明显差异,所用方法能准确区分两组大鼠。

3.3 差异代谢物筛选结果

根据 OPLS-DA 模型第一主成分变量重要性值(VIP)结果,并结合单因素方差分析的 P 值,以 VIP 值>1 且 $P<0.05$ 为条件来筛选具有表达差异的代谢物,最终得到 19 种组间差异代谢物。与正常组比较,模型组蔗糖酸、半胱氨酸、鸟氨酸、丙氨酸、4-羟基-脯氨酸、苏氨酸、甲基半胱氨酸、天冬酰胺、花生四烯

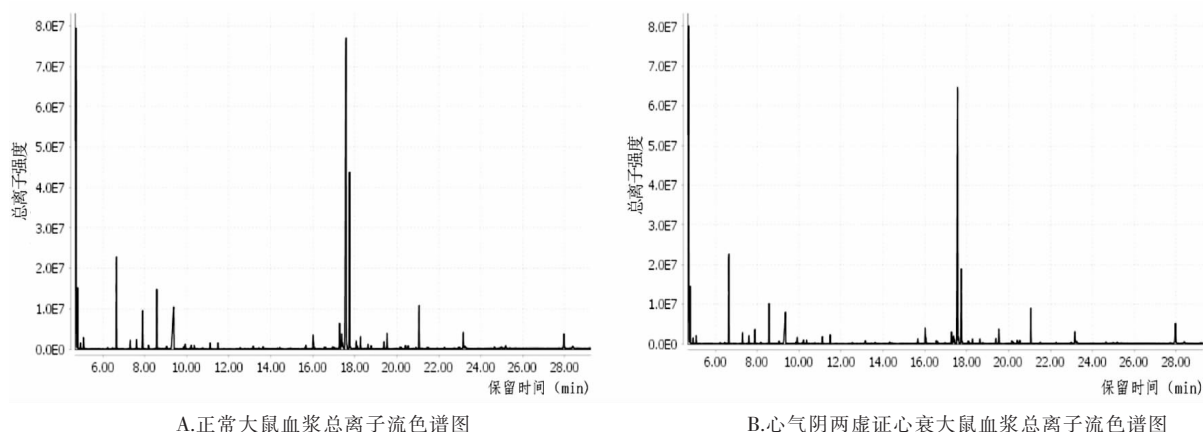
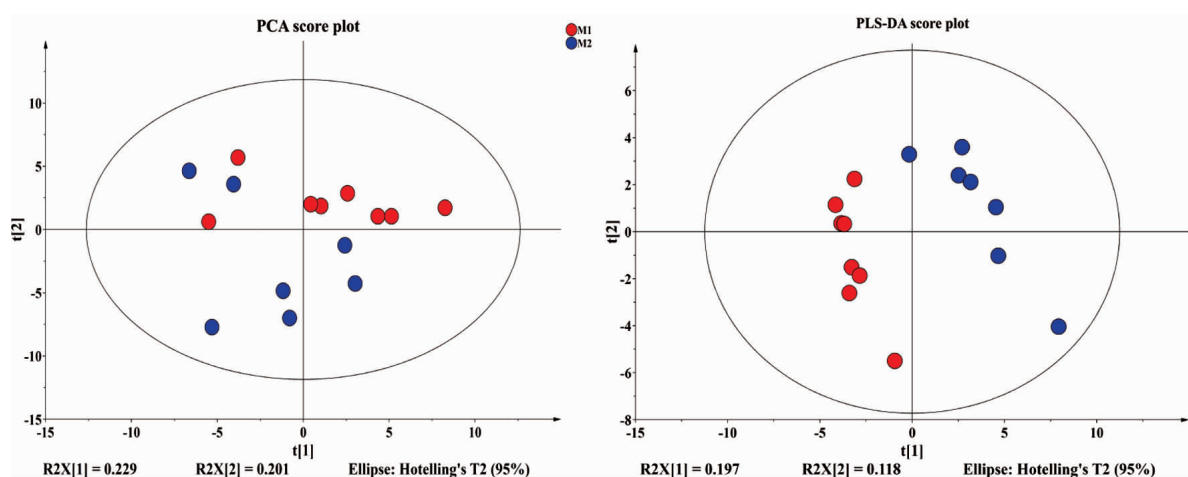


图 1 心气阴两虚证心衰大鼠与正常大鼠总离子流色谱图



注:M1 为正常组(红点),M2 为模型组(蓝点)。左为 PCA,右为 PLS-DA。

图 2 心气阴两虚证心衰大鼠与正常大鼠的 PCA、PLS-DA 得分图

酸、胆固醇、苏糖醇、丙酮酸、焦谷氨酸浓度上升;色氨酸、亮氨酸、木糖醇、核糖醇、丙二酸、尿素浓度下降。见表1。

表1 心气阴两虚证心衰大鼠与正常大鼠间19种差异代谢物

序号	代谢物名称	代谢途径	模型组浓度变化
1	苏糖酸	氨基酸生物合成	上升
2	半胱氨酸	氨基酸生物合成	上升
3	色氨酸	氨基酸生物合成	下降
4	亮氨酸	支链氨基酸降解	下降
5	鸟氨酸	氨基酸生物合成	上升
6	丙氨酸	氨基酸代谢/糖异生	上升
7	4-羟基-脯氨酸	氨基酸生物合成	上升
8	苏氨酸	氨基酸生物合成	上升
9	甲基半胱氨酸	氨基酸生物合成	上升
10	天冬酰胺	氨基酸生物合成	上升
11	花生四烯酸	不饱和脂肪酸代谢	上升
12	胆固醇	脂肪的消化和吸收	上升
13	苏糖醇	果糖和甘露糖代谢	上升
14	木糖醇	戊糖、葡萄糖醛酸转换	下降
15	核糖醇	戊糖、葡萄糖醛酸转换	下降
16	丙酮酸	糖酵解	上升
17	焦谷氨酸	有机酸代谢	上升
18	丙二酸	磷酸肌醇代谢	下降
19	尿素	鸟氨酸循环	下降

4 讨论

心衰的病理生理过程十分复杂,现有的治疗方法依然难以控制疾病的发展^[5]。代谢组学技术的发展,为从代谢角度揭示心衰病理生理学过程的动态变化及它们所包含的生物学意义提供了新的方法,同时它所采用的现代生物学技术可以克服传统中医四诊方法的局限,为从生物代谢的角度研究中医证候的现代内涵提供可靠依据,是中医“证”本质研究方法的拓展和深化^[6]。

已鉴定的差异代谢物中,氨基酸类占比重最大。其中色氨酸、亮氨酸和苏氨酸属于必需氨基酸,必需氨基酸是合成蛋白质的重要原料,机体内不能合成,必须从食物中摄取。正常情况下心脏代谢最主要的能源来源于游离脂肪酸、葡萄糖的氧化,而氨基酸供能甚少,氨基酸的代谢异常提示心衰大鼠的糖、脂有氧代谢功能不足,需要动员外周组织氨基酸代谢加强供能^[7]。

与糖类代谢紊乱相关的代谢物有丙氨酸、丙酮酸、苏糖醇、木糖醇和核糖醇。丙氨酸可通过糖异生

途径转化成葡萄糖,其水平上升提示丙氨酸-丙酮酸-葡萄糖循环的紊乱,机体氧化功能障碍进一步加重^[8]。丙酮酸水平上升提示糖酵解途径异常,心衰时机体缺氧,糖的有氧氧化功能下降,糖酵解增强以供给能量。苏糖醇与果糖、甘露糖代谢相关,木糖醇、核糖醇与葡萄糖醛酸转换途径相关,上述3种多元醇类代谢物异常也提示了机体的糖代谢紊乱存在。

与脂类代谢紊乱相关的代谢物有花生四烯酸和胆固醇。胆固醇属于类固醇化合物,是血脂的重要组成部分,能与脂肪酸结合成酯;花生四烯酸属于不饱和脂肪酸,在血液、肝脏和其他器官系统中作为磷脂结合的结构脂类起重要作用,对脂质蛋白的代谢具有调节作用,花生四烯酸和胆固醇的水平上升提示心衰大鼠出现脂质堆积,引起能量代谢障碍。

氨基酸在体内贮存的主要代谢场所为肝脏,肝脏又是合成尿素、脂肪酸和胆固醇的主要器官,氨基酸、脂肪酸、尿素和胆固醇的代谢异常在一定程度上反映了肝功能出现损害。尿素下降提示肾功能可能受损,但本次研究未能在血浆中检测出肌酐等与肾功能密切相关的代谢物,是否存在肾功能损害有待进一步研究。

三羧酸循环作为三大营养素(糖类、脂类、氨基酸类)的最终代谢通路,是需氧生物体内普遍存在的代谢途径,分布在线粒体内。线粒体的形状、功能与细胞骨架密切相关,心衰时心肌的损伤可以导致细胞骨架的改变,同时心衰后各种损伤原因均可导致线粒体功能的损伤^[9]。既往的心衰代谢组学研究^[10-12]发现心衰时机体存在三羧酸循环中间产物或底物代谢紊乱。值得注意的是,本次研究发现模型大鼠血浆中与三羧酸循环相关的柠檬酸、琥珀酸水平均低于正常大鼠,但差异无统计学意义($P>0.05$),具体机制有待进一步研究。

中医学认为,心气阴两虚证是心衰的常见证型之一,多出现在心衰的早期或中期^[13],本研究采用病理证结合的动物模型,贴近临床实际,可以很好地模拟人类心衰的病理特点。研究通过PCA得分图和PLS-DA得分图证实了心衰大鼠和正常大鼠具有不同的代谢模式,提示心衰大鼠的代谢功能被明显干扰,其血浆代谢谱中包含更多的病理化信息。通过OPLS-DA对组间差异变量进行分析,鉴定出19种

代谢物对分类贡献较大,可能为该心衰模型的生物标志物;并通过差异代谢物这些关键信息点,明确了与其相关的代谢途径,提示该模型的氨基酸代谢、脂代谢、糖代谢紊乱和肝功能受损,这些关键信息区分了模型大鼠与正常大鼠不同的代谢模式,同时也反映与该病证模型病理生理相对应的代谢网络发生异常后物质和功能的改变^[14]。鉴于目前还没有一种代谢组学技术能涵盖生物体内所有内源性代谢物,单纯使用GC-MS技术可能导致部分关键信息的缺失,课题组计划在下一步研究中采用核磁共振谱仪等技术从更广泛的代谢途径阐释该病证模型的代谢特点。

参考文献:

- [1] ORESIC M, VIDAL-PUIG A, HANNINEN V. Metabolomic approaches to phenotype characterization and applications to complex diseases[J]. *Expert Rev Mol Diagn*,2006,6(4):575-585.
- [2] 简维雄,袁肇凯.中医证候与代谢组学研究[J].*中华中医药学刊*,2009,27(2):351-352.
- [3] 李欣春,梁 昊,胡志希,等.高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(3):245-248.
- [4] 李欣春,梁 昊,胡志希,等.高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(8):853-857.
- [5] KRUEGER K, BOTERMANN L, SCHORR S G, et al. Age-related medication adherence in patients with chronic heart failure: A systematic literature review[J]. *Int J Cardiol*, 2015,18(4):728-735.
- [6] 张 静,刘 龙,颜 新,等.中医证本质研究与代谢组学技术:现状与思考[J].*中西医结合学报*,2012,10(10):1069-1076.
- [7] 王 欢,胡元会,孟 浩,等.心复康口服液对心肌梗死后心力衰竭大鼠血浆代谢组学影响的研究[J].*北京中医药*,2013,32(8):613-617.
- [8] 王 娟.慢性心力衰竭中医证候生物学诊断模式及代谢组学研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [9] 刘 培,肖隋熙,罗 颖,等.自发性高血压大鼠左心室肥厚的蛋白质组研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(6):605-613.
- [10] 李琪琳,张安晶,吴华芹,等.基于 ¹H-NMR 技术研究心气虚证心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学变化[J].*北京中医药*,2013,32(12):939-943.
- [11] 郑海生,蒋 健,贾 伟,等.慢性心力衰竭肾阳虚证患者代谢组学研究[J].*中华中医药杂志*,2010,25(2):198-201.
- [12] 牛倩芸.基于代谢组学技术的黄芪抗心衰作用机制研究[D].太原:山西大学,2015.
- [13] 董晓斌,孔 立.慢性心力衰竭的中医病机演变探讨[J].*环球中医药*,2011,4(3):201-203.
- [14] 简维雄,肖隋熙,刘 培,等.自发性高血压大鼠左心室肥厚的代谢组学研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(4):365-371.

(本文编辑 杨 璞)