

。 实验研究 。

高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀演变的代谢组学研究

刘卫红¹ 张琪² 颜贤忠² 张蕾¹ 孙博² 游云³ 王丽华¹ 李文³ 殷小杰³

(1.首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医研究所,北京市东城区美术馆后街23号,100010;

2.国家生物医学分析中心; 3.中国中医科学院中药研究所)

[摘要] 目的 探讨痰瘀证候的动态演变、时相特点和由痰致瘀在代谢方面的变化。方法 选用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 72 只,随机分为正常对照组和模型组,每组 36 只。以高脂饲料喂饲法复制大鼠高脂血症模型。分别于第 2 周、第 4 周和第 8 周腹主动脉取血,采用核磁共振波谱仪检测并进行主成分分析。结果 大鼠血浆 ^1H NMR 谱的主成分分析结果显示,各组大鼠代谢谱各不相同。随着造模时间的延长,不同时间模型组大鼠的代谢谱亦各不相同,表明高脂血症前期以脂质代谢紊乱为特点,随着病程进展,参与血液凝固过程的乙酰糖蛋白的出现,说明凝血机制出现异常,同时酮体及乳酸的升高说明脂质代谢紊乱进一步加重,这与同时检测的血脂、血液流变学结果相一致。结论 可能从代谢组学分析中找出痰瘀演变过程特异的标志性代谢产物,以阐释中医痰瘀证候的生物学本质。

[关键词] 代谢组学;模式识别;核磁共振;高脂血症;痰证;瘀证

Metabonomics Study on Phlegm and Blood Stasis Evolution of Hyperlipidemia and Atherosclerosis

LIU Wei-hong¹, ZHANG Qi², YAN Xian-zhong², et al.

(1. Beijing TCM hospital, Capital Medical University, Beijing 100010; 2. National Center of Biomedical Analysis)

ABSTRACT Objective To explore the dynamic evolution and phase characteristics of phlegm and blood stasis and the conditions of evolution from phlegm to stasis for studying its biological features from the lipid metabolism. **Methods** Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into the control group and model group with 36 in each. The hyperlipidemia models were established by feeding high fat forage. At the second, 4th and 8th week, plasma was collected from the abdominal aorta and detected by nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer for the principal component analysis (PCA). **Results** The PCA of rat plasma ^1H NMR spectra revealed different metabolic spectra between model and control groups. With the time prolonging of model making, the different metabolic spectra were showing lipid metabolism disorder at the early stage of hyperlipidemia, later the appearance of acetyl glycoproteins which involved in the blood coagulation, and then the increase of lactate and lactic acid which meant the aggravation of lipid metabolism disorders, consistent with the changes of blood lipids and hemorheological parameters. **Conclusion** Characteristic metabolic products in the evolution from phlegm to stasis can be identified by NMR based metabonomics analysis to interpret the biological features of TCM syndromes.

Key Words Metabonomics; Pattern recognition; Nuclear magnetic resonance (NMR); Hyperlipidemia; Phlegm; Blood stasis

高脂血症及动脉粥样硬化是引发心脑血管疾病最重要的因素。痰证和瘀证是高脂血症及动脉粥样硬化中最具典型性的两个证候类型。我们运用高脂饲料喂饲法复制大鼠高脂血症模型,通过动态观察高脂血症、动脉粥样硬化发病过程中的代谢产物,探讨高脂血症、动脉粥样硬化痰瘀演进过程中的生物标志物,揭示痰瘀证候的动态演变、时相特点和由痰致瘀的条件。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 72 只,SPF 级,体重 (195±10) g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。许可证编号:SCXK(京)2005-0013

1.2 药物与试剂

肝素钠购自上海生物化学试剂商店;重水 (deuterium oxide, D_2O) 为美国 CIL 公司产品;氘代三甲基硅烷基丙酸 (trimethylsilyl-3-propionic-D4 acid, TSP) 为美国 Aldrich 公司产品。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目 (7072013);北京市优秀人才培养专项资助项目 (20051D0300721)

通讯作者:颜贤忠, yanx @ proteomics.cn, (010) 66930305

1.3 仪器

Varian Unity INOV A600超导傅立叶变化核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克公司产品;5424型离心机,德国Eppendorf公司产品

2 方法

2.1 动物模型的建立

采用高脂饲料喂饲法复制大鼠高脂血症模型,高脂饲料参照文献 [1] 所述方法配制:胆固醇 4%,猪油 10%,丙基硫氧嘧啶 0.2%,胆酸钠 0.3%,基础饲料 85.5%。由中国医学科学院实验动物研究所工作人员混匀后,压制成高脂饲料,进行饲喂

2.2 动物分组与给药方法

实验动物普通饲料喂养 3 天后,采用随机数字表法分为正常对照组和模型组,每组 36 只。正常对照组给予基础饲料,模型组给予高脂饲料。饲料以每天 20g / 只投放,实验期间自由饮水。饲养环境:温度 22~ 25℃,湿度 70%。

2.3 检测指标及方法

分别于造模第 2 周、第 4 周及第 8 周,每次两组大鼠各 12 只用 2% 水合氯醛 45mg / kg 体重腹腔注射麻醉,固定于鼠板上,依次切开腹部皮肤,分离腹主动脉,取血,加入肝素钠抗凝管中,制备血浆用于代谢组学分析。采集的血浆于 - 80℃ 冰箱中保存备用。

NMR 测量前样品准备:取出血浆,常温解冻,离心 (14000 转 / 分钟,10 分钟),取上清 300μl,添加 0.1% TSP 重水溶液 100μl 200μl D₂O 于 5mm 样品管中,混匀,于 4℃ 冰箱保存备用。

NMR 数据采集:在军事医学科学院生物医学分析中心核磁共振实验室进行检测,27℃ 条件下,在 Varian Unity INOV A600 超导傅立叶变化核磁共振波谱仪上调用弛豫时间编辑 (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, CPMG) 和扩散编辑 (longitudinal eddy-delay, LED) 相关

脉冲序列,采用预饱和方式抑制水峰,预饱和时间为 2 秒,谱宽 8000Hz,采样点数 32k,累加次数 64 次,预饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减 (free induction decay, FID) 信号经过 32k 点傅立叶变换转为一维 NMR 谱图。以 TSP 为化学位移参考峰的位置,设为 0ppm。调用 VNMR 软件中的程序将 ¹H 谱按 4.5~ 0.5ppm (CPMG 实验) 以及 6.0~ 0ppm (LED 实验) 的范围进行分段积分,每段为 0.04ppm。将积分数据归一化之后,以文本文件或 Excel 文件贮存,用于模式识别分析。

2.4 统计学方法

将积分值进行中心化和比例换算,用 SIMCAP10.0 软件包 (瑞典, Umetrics AB, Umea) 进行主成分分析,必要时进行判别分析 (partial least squares discriminate analysis, PLS-DA)。由此寻找和发现各组大鼠血浆之间的代谢差异,找出特征差异代谢物。

3 结果

3.1 大鼠血浆样本的 ¹H NMR 谱图

图 1 图 2 为各组大鼠血浆样本的弛豫编辑和扩散编辑 ¹H NMR 图谱。其中弛豫编辑谱主要包括血浆中的小分子代谢物,如葡萄糖、氨基酸、其他有机酸以及胆碱等,而扩散编辑谱则主要包含来自于脂蛋白中的脂肪酸的信号。

3.2 正常对照组与模型组大鼠血浆 ¹H NMR 谱模式识别分析

正常对照组与模型组大鼠血浆的 CPMG ¹H NMR 谱的 PLS-DA 分析结果显示,正常对照组与模型组样本间大致能区分开来,但是稍有重叠。与正常对照组比较,模型组样本中的乳酸 (δ1.34, δ4.1)、乙酸 (δ1.9)、丙氨酸 (δ1.46)、葡萄糖 (δ3.2~ 3.9)、氧化三甲胺 (δ3.26) 和 O-乙酰糖蛋白 (OAc, δ2.1, 2.14) 含量较高,而胆碱 (δ3.22) 含量减少。

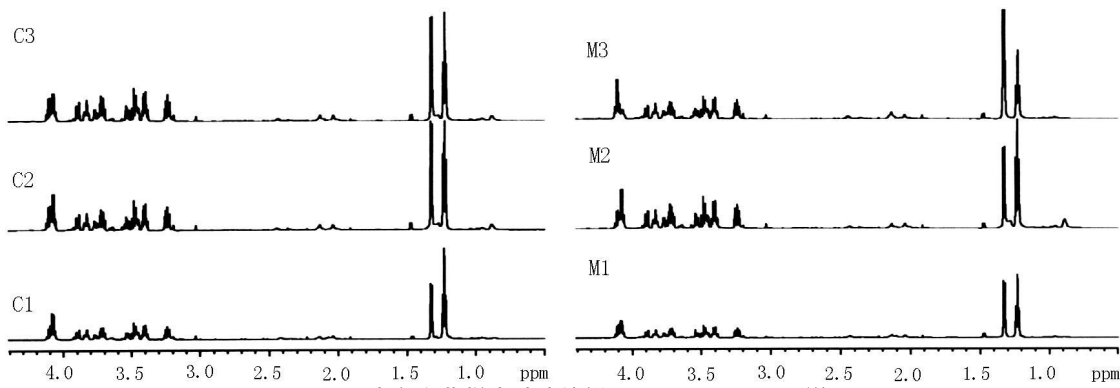


图 1 大鼠血浆样本弛豫编辑 (cpmg) ¹H NMR 图谱

C1 2 周正常对照组; C2 4 周正常对照组; C3 8 周正常对照组; M1 2 周模型组; M2 4 周模型组; M3 8 周模型组

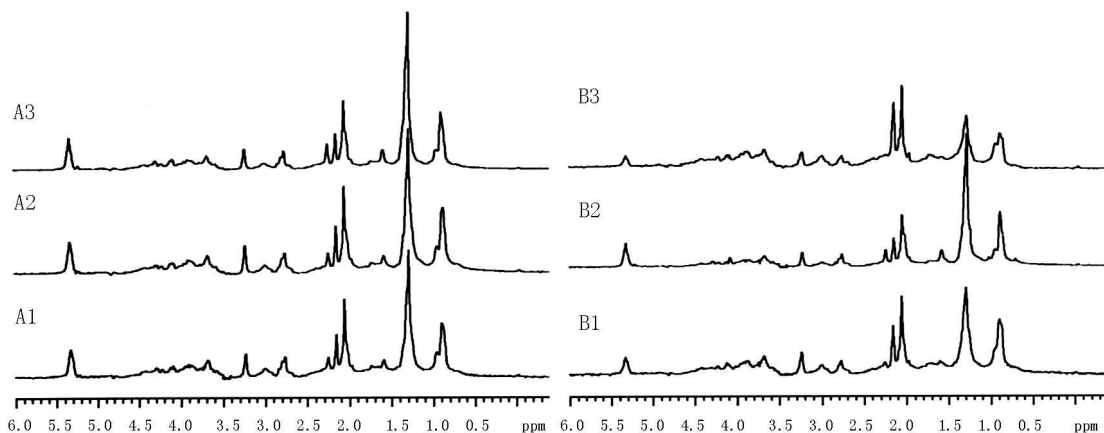


图 2 大鼠血浆样本扩散编辑 (led) ^1H NMR 图谱

A1 2周正常对照组; A2 4周正常对照组; A3 8周正常对照组; B1 2周模型组; B2 4周模型组; B3 8周模型组

LED实验 ^1H NMR谱的 PLS-DA分析结果表明,正常对照组与模型组之间差异明显。与正常对照组比较,模型组血浆样本中极低密度脂蛋白(VLDL, δ 0.9, 0.94, 1.34和 1.38),胆固醇(δ 0.74)、N-乙酰糖蛋白(N-Ac, δ 2.02, 2.06), O-乙酰糖蛋白(O-Ac, δ 2.14)等化合物含量相对较高;而 LDL/HDL(δ 0.86, 1.26, 1.30),磷脂酰胆碱(δ 3.26, 3.22)、不饱和脂肪酸(δ 2.78, 2.82, 5.3, 5.34)等化合物含量减少。

综合以上 CPMG 和 LED 分析结果,与正常对照组比较,模型组大鼠血浆中差异性代谢物见表 1

表 1 大鼠血浆中差异性代谢物信息表

代谢物	积分段(化学位移, δ)	强度变化
乳酸	1.34, 4.10	↑
丙氨酸	1.46	↑
乙酸	1.90	↑
N-乙酰糖蛋白-NCH ₃	2.02, 2.06	↑
O-乙酰糖蛋白-OCH ₃	2.10, 2.14	↑
氧化三甲胺(TM AO)	3.22	↑
磷脂酰胆碱	3.22, 3.26	↓
葡萄糖	3.2-3.9	↑
胆固醇	0.74	↑
VLDL(-CH ₃)	0.90, 0.94	↑
LDL/HDL(-CH ₃)	0.86	↓
VLDL-(CH ₂) _n	1.30, 1.34	↑
LDL/HDL-(CH ₂) _n	1.26, 1.30, 2.26	↓
不饱和脂肪酸	2.78, 2.82, 5.3, 5.34	↓

3.3 不同时间点模型组大鼠血浆 ^1H NMR谱模式识别分析

3个不同时间点模型组大鼠血浆 CPMG ^1H NMR谱的 PCA分析结果表明,不同饲养时间的 3个模型组样本间有一定差别,其中 8周模型组与其他两组的差别较大,而 4周模型组与 2周模型组的差别不明显。与 2周模型组和 4周模型组比较,8周模型组样本中, O-乙酰糖蛋白(δ 2.14), 肌酐(δ 3.02, 3.94), 3-羟基

丁酸(δ 1.18)等代谢物含量相对较高,而乳酸(δ 1.34, 4.1), 丙氨酸(δ 1.46)和胆碱(δ 3.22)则较低。与 2周模型组比较, 4周模型组的乳酸(δ 1.34, 4.1), 丙氨酸(δ 1.46)也相对较低。

LED实验分析结果表明,随着喂以高脂饲料时间长短不同,模型组不同时间点的样本之间能较好的分开。4周模型组与 2周模型组比较,样本中血脂上升(δ 1.3, 1.34, 0.9, 5.34),而 N-乙酰糖蛋白(δ 2.06), O-乙酰糖蛋白(δ 2.14, 2.18)的含量相对较低;与 2周模型组和 4周模型组比较,8周模型组样本中主要是 N-乙酰糖蛋白(δ 2.06), O-乙酰糖蛋白(δ 2.14, 2.18)的含量相对较高,磷脂酰胆碱(δ 3.26)略高, VLDL(δ 0.94)含量也较高,但总的脂肪酸含量降低。

综合以上 CPMG 和 LED 分析结果,模型组大鼠造模不同时间血浆中差异性代谢物见表 2

表 2 不同时间点模型组大鼠血浆中差异性代谢物信息表

代谢物	2周模型组	4周模型组	8周模型组
乳酸	↑	↓	
3-羟基丁酸	↑	↑	
丙氨酸	↑	↓	↓
乙酸			↑
N-乙酰糖蛋白-NCH ₃			↑
O-乙酰糖蛋白-OCH ₃			↑
肌酐			↑
胆碱			↓
磷脂酰胆碱			↑
胆固醇		↑	
VLDL	↑	↑	↑
LDL/HDL	↑	↑	↓
不饱和脂肪酸	↑	↑	↓

4 讨论

现代研究表明,脂质代谢紊乱是“痰浊”的物质基础,血液流变学异常是“痰瘀痹阻”客观指征。研究发现总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及低密度脂蛋白胆固

醇 (LDL-C) 的升高是高脂血症痰浊的主要特征和生化物质基础^[2]。动脉粥样硬化的发生发展以动脉壁内皮细胞为始动因素,血小板黏附聚集、释放生物活性物质和平滑肌细胞增殖为主要环节,脂质侵入,动脉壁弹性纤维破坏,引起动脉管腔狭窄为病理结果,这些改变属于中医学“瘀血”范畴。因此,脂质代谢异常 [TG、TG/LDL-C 升高,高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 下降] 可作为动脉粥样硬化“痰浊”的物质基础,而动脉粥样硬化血液的高黏滞性、血液流变性及血小板功能改变与中医“血瘀”病理呈一致性变化^[3]。

血脂及血流变结果显示,在造模的第 2 周脂质代谢异常明显,且随着造模时间的推移,TG、TG/LDL-C 逐渐增高,HDL-C 逐渐降低。造模第 4 周血液流变学部分指标 (血浆黏度及热沉蛋白) 已显示异常,至 8 周时全血黏度、血浆黏度、红细胞压积及热沉蛋白均显著异常,表明随着造模时间的推移,血液流变异常逐渐加重,血液瘀滞明显^[4],与王东生等^[5]的报道一致。可见,高脂血症向动脉粥样硬化发展过程中存在“由痰致瘀”、“痰瘀互结”的病理状态。与“痰浊”的物质基础比较,血瘀证的发生往往在痰浊证之后,是属于动脉粥样硬化的较晚阶段,也印证了中医“久病皆瘀”、“瘀多夹痰”的理论^[6]。

本实验运用代谢组学技术,动态观察高脂血症向动脉粥样硬化发展过程中“由痰致瘀”的生化物质基础。从¹H NMR 图谱及模式识别分析发现: (1) 正常对照组与模型组之间存在代谢产物谱的显著差异,随着造模时间的延长,模型组不同时间点的样本之间能较好的分开,说明血浆代谢组学分析能够较好地反映疾病证候的动态演变,代谢组学技术是开展中医证候研究的好方法。 (2) 在¹H NMR 图谱中可以发现乳酸、乙酸、丙氨酸、葡萄糖、氧化三甲胺、O-乙酰糖蛋白、胆碱、VLDL、LDL/HDL 不饱和脂肪酸等的谱峰强度改变较为明显。乳酸是体内三羧酸循环的中间产物,其代谢异常是能量代谢紊乱的标志;丙氨酸的代谢异常与肾小球的滤过和回收功能有关;乙酸的代谢异常则是肝功能损伤的标志;胆碱是一种维生素类化合物,它对细胞膜完整性及脂类消化运输发挥重要作用。整合这些资料提示,高脂血症大鼠体内不仅脂肪和能量代谢紊乱,并存在肝肾功能的损害。 (3) 随着造模时间的延长,由 2 周的 VLDL 升高,经 4 周时各种脂肪酸和血糖升高,至 8 周时以 N-乙酰糖蛋白、O-乙酰糖蛋白、酮体、肌酐以及乳酸升高为主。结果表明,高脂血症前期以脂质代谢紊乱为特点,即高脂血症痰浊的生化物质基础,随着病程进展,乙酰糖蛋白,尤其是 O-乙酰糖蛋白的

出现,说明凝血机制出现异常。因为参与血液凝固过程的纤维蛋白原、凝血酶原和几种凝血因子都是糖蛋白。因此,乙酰糖蛋白谱峰的改变可能是高脂血症大鼠模型血瘀的早期生物标记物。同时脂肪产生热量供机体活动的需要时,脂肪分解产生酮体及能量代谢产生大量乳酸,脂质代谢紊乱进一步加重,这与同时检测的血脂、血流变结果相一致。分析这些内源性代谢产物的形成、转移机制和过程,可提示痰瘀证候的动态演变、时相特点和由痰致瘀的条件,从而揭示其生物学本质。

本研究 NMR 图谱中的谱峰变化反映造模不同阶段的整体状态,表明高脂血症痰瘀演变过程中存在着非常明显的代谢产物的不同,这种不同是基于痰湿证和血瘀证存在着不同的物质代谢或其代谢网路的改变。因此,中医证候的生物学基础可用代谢组学技术找出特异的标志性代谢产物,并用生物信息学方法分析生物标志物的功能,确定中医证候相关代谢谱。

参考文献

[1] 宋小鸽,唐照亮,侯正明,等.茶多酚对高脂血症动物的预防作用.中国中药杂志,1999,24(9): 562~ 564.
[2] 宋剑南,刘东远,牛晓红,等.高脂血症与中医痰浊关系的实验研究.中国中医基础医学杂志,1995,1(1): 49~ 51.
[3] 陈可冀,马晓昌.关于传统血瘀证的现代分类.中国中西医结合杂志,2000,20(7): 487.
[4] 刘卫红,张蕾,游云,等.高脂血症大鼠痰瘀证候的病理演变.北京中医药,2008,27(3): 223~ 225.
[5] 王东生,袁肇凯,陈方平等.动脉粥样硬化大鼠“痰瘀”病理演变与血管平滑肌细胞凋亡的相关性研究.中国中医药信息杂志,2005,12(2): 38~ 40.
[6] 马杰,陈剑秋.祛痰化痰法治疗动脉粥样硬化的临床与实验研究.中国中西医结合杂志,2006,26(12): 1135~ 1138.

(收稿日期: 2007- 12- 27;修回日期: 2008- 05- 08)

[编辑: 李长今]



真空式全自动煎药器

海元牌真空式全自动煎药器是新型实用专利产品 (ZL200720116054.X)。本产品采用电加热,在密闭状态下可一次煎煮完成整剂中草药。采用内外两层特殊轻质耐高温玻璃真空煎煮,符合卫生标准。利用真空原理挤压药物,使中药有效成分得到充分析出,浓度高,成分均匀,煎完后不必人工榨药。自动控制药量、电源定时、调高低温 3 种控制系统。采用高效率的加热器,加热均匀,热效率高,省时、省电。产品有: 3 000ml 真空式全自动、3 000ml 陶瓷全自动,适用于家庭; 7 000ml、12 000ml、14 000ml、18 000ml 真空式全自动,适用于中小中医院。产品还有简易封袋机、高温药液真空包装袋。

天津塘云塑胶有限公司,地址: 塘沽区新城镇邓善沽村金光路,邮编: 300455,电话: 022- 25391437 25391741,手机: 13212071778 13039977082
网址: www.jyq.sz667.com