

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.10.014

实验研究

冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢组学研究

周曼丽, 钱舒乐, 胡伊蕾, 马至言, 高翎薇, 简维雄[✉]

湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市学士路300号, 410208



[摘要] 目的 运用代谢组学的方法探讨冠心病(CHD)心血瘀阻证的潜在生物学基础。方法 20只SD大鼠随机分为正常组8只和心血瘀阻证组12只。心血瘀阻证组采用高脂饲料喂养结合维生素D3灌胃、异丙肾上腺素皮下注射制备冠心病心血瘀阻证模型。观察两组大鼠心脏组织病理学以及心肌细胞线粒体超微结构变化;运用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术对大鼠心肌组织进行代谢组学研究,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)筛选组间差异代谢物并进行相关代谢通路的分析,并利用受试者工作特征曲线(ROC)对潜在生物标志物用于冠心病心血瘀阻证诊断的准确性进行评价。结果 正常组大鼠心肌细胞排列整齐,结构清晰,线粒体排列规则,结构完整;心血瘀阻证组大鼠心肌细胞肥大水肿,肌纤维肿胀,可见炎症细胞浸润,线粒体大小不一,数量减少,排列紊乱,部分线粒体已溶解破裂,膜结构消失。两组大鼠的内源性代谢物存在显著差异,得到19种组间差异代谢物。与正常组比较,心血瘀阻证组中磷酸三苯酯、肌昔、TrHA、牛磺酸、泛酸、丙基硫氧嘧啶表达水平上调;LysoPC [18:2(9Z,12Z)]、PE [18:1(9Z)/0:0]、PE [0:0/18:2(9Z,12Z)]、PC [18:2(2E,4E)/0:0]、PC [18:2(9Z,12Z)/0:0]、PC [18:1(9Z)/0:0]、PG (16:0/0:0) [U]、L-异亮氨酸、2-羟基肉桂酸、DG [15:1(9Z)/18:1(9Z)/0:0] [iso2]、黄嘌呤、甲胺、L-苯丙氨酸表达水平下调。涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,氨酰-tRNA生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,牛磺酸和亚牛磺酸代谢等多条代谢通路。ROC评价结果显示,L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、牛磺酸这3种差异代谢物对冠心病心血瘀阻证预后判断具有较高的预测价值。结论 冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢产物主要涉及氨基酸代谢、脂类代谢和嘌呤代谢等多个层面,其中L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、牛磺酸这3种代谢物有望作为标志物单独或者联合用于冠心病心血瘀阻证的早期诊断。

[关键词] 冠心病;心血瘀阻证;代谢组学;心肌组织;L-苯丙氨酸;L-异亮氨酸;牛磺酸

冠心病是一种慢性复杂性疾病,是由冠状动脉粥样硬化引起的血管腔狭窄和供血不足而导致的心脏功能障碍或器质性病变^[1]。冠心病可属于中医学“胸痹”“真心痛”的范畴,其基本病机是心脉不通,心血瘀阻证是冠心病最常见的证型^[2]。有研究显示,冠心病心血瘀阻证的基本病理是心肌缺血,其发病与心肌细胞能量代谢密切相关^[3]。代谢组学系统反映体内小分子代谢物变化,与其他“组学”相比,被认为更加接近生物学表型,能够直观反映

各个生物层次调控后的代谢结果^[4-5]。用于非靶向和定量分析的液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术已成为测量机体代谢小分子成分的首选工具^[6]。本研究利用LC-MS技术分析冠心病心血瘀阻证模型大鼠心肌组织代谢图谱变化,探索能够判别心血瘀阻证区别于正常大鼠的差异代谢物群及潜在生物标志物,并探讨其代谢途径,以期为进一步研究提供思路。本研究通过湖南中医药大学动物伦理委员会审查(审批号:LL2019092008)

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠20只,4~6周龄,体重200~220g,购自湖南斯莱克景达动物有限公司,

基金项目:国家自然科学基金(81973753);湖南省省级科技发展计划(自然科学基金)(2018JJ2291);湖南中医药大学校级研究生培养质量工程项目(2020CX57,2020CX40);中医诊断学湖南省重点实验室项目

✉ 通讯作者:daxiong20001977@163.com

实验动物质量许可证号: SCXK (湘) 2019-0004。饲养环境温度 22~26℃, 相对湿度为 40%~60%, 每笼 3 只, 早 8 点至下午 5 点自动灯光照明, 自由饮水和进食 1 周后用于实验。

1.2 主要试剂及仪器

维生素 D3 (湖北楚米生物科技有限公司, 批号 2019070401); 异丙肾上腺素 (ISO, 批号 BSF190725)、苏木素 (批号 517-28-2), Sigma 公司; 伊红 (批号 15086-94-9)、电镜固定液 (批号 P1126), 北京索莱宝科技有限公司; 枸橼酸铅 (ALDRICH 化学试剂公司, 批号 0000092306); 4% 多聚甲醛 (Biosharp 公司, 批号 143174); 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 批号 20112701); 甲醇 (批号 CFEQ-4-140000-9025)、甲酸 (批号 CFEQ-4-531380-0001)、乙腈 (批号 SP002A-4L-C), CNW 科技公司; L-2-氯苯丙氨酸 (上海恒创生物科技有限公司, 批号 103616-89-3); 溶血磷脂酰胆碱 (LysoPC) 17:0 (美国 Avanti 公司, 批号 855676C); 高脂饲料 (3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料, 湖南斯莱克景达动物有限公司)。

高效液相色谱仪 (型号 ACQUITY UPLC)、色谱柱 (型号 ACQUITY UPLC BEH C18 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), Waters 公司; 高分辨质谱仪 (AB Sciex 公司, 型号 Triple TOF 5600); 冷冻浓缩离心干燥器 (太仓市华美生化仪器厂, 型号 LNG-T98); 台式高速冷冻离心机及轮转式切片机 [赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司, 型号 75002455]; 全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司, 型号 JXFSTPRP-24/32); 超纯水系统 (ELGA 公司, 型号 PURELAB® Chorus); 生物组织包埋机 (型号 KD-BMII)、生物组织摊片机 (型号 YD-A), 浙江金华益迪医疗设备有限公司; 光学显微镜 [麦克奥迪 (厦门) 医疗诊断系统有限公司, 型号 Moticam Pro 205A]; 透射电镜 (HITACHI 公司, 型号 HT7700); 16 导联生理记录仪 (美国 BIOPAC 公司, 型号 MP150); 有机相针孔过滤器 (安谱公司, 型号 SCAA-104)。

1.3 分组与造模

运用 SPSS 21.0 软件通过简单随机抽样法选取 8 只大鼠作为正常组, 其余 12 只大鼠作为心血瘀阻证组用于制备动物模型。参照课题组以往的研究方法制备心血瘀阻证动物模型^[7-8]: 使用高脂饲料 (饲料配方: 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基

硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料 (湖南斯莱克景达动物有限公司) 喂养 7 天后于第 8 天用维生素 D3 溶液 (30 万 U/kg) 灌胃 1 次, 第 14 天时继续维生素 D3 溶液 (20 万 U/kg) 灌胃 1 次, 高脂饲料继续喂养 7 周, 随后将造模大鼠予以背部皮下多点注射 ISO 5 mg/(kg·d) 连续 3 天, 以心电图 J 点上升或 ST 段出现上抬或明显压低 (≥0.1 mV) 为造模成功的标志^[9]。造模过程中 2 只大鼠死亡, 实验结束后有 8 只大鼠造模成功。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 心肌组织病理形态 造模成功后采用异氟烷呼吸麻醉大鼠, 开胸在左心室心前区取圆环形心肌组织 100 g 左右, 各组取材部位保持一致。4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 梯度酒精脱水后使用苏木素染料进行核染, 伊红染液使胞质着色, 光学显微镜下观察心肌形态。

1.4.2 心肌组织线粒体形态、数量 剪取大鼠心前区 1 mm³ 大小心肌组织迅速投入电镜固定液固定 2~4 h, 超薄切片机切片, 铀铅双染色后室温干燥过夜, 透射电子显微镜下观察, 采集图像分析。

1.4.3 心肌代谢组学 开胸后剪取每只大鼠心前区心肌组织 >50 mg, 置于冻存管后迅速投入液氮保存, 12 h 后转移至 -80℃ 冰箱保存, 直至上机检测。具体操作如下: 1) 称取 30 mg 样本, 加入内标 (L-2-氯苯丙氨酸, 0.3 mg/ml; Lyso PC 17:0, 0.01 mg/ml, 均为甲醇配置) 各 20 μl, 加入 400 μl 甲醇水溶液 (CH₃OH:H₂O v:v=4:1); 2) 两个小钢珠在 -20℃ 放置 2 min 预冷后加入研磨机 (60 Hz, 2 min); 3) 冰水浴中超声提取 10 min; 4) -20℃ 静置 20 min; 5) 离心 10 min (离心半径 8.26 cm, 13 000 r/min, 4℃), 取 300 μl 上清液挥干, 然后用 400 μl 甲醇水溶液 (v:v=1:4) 复溶, 涡旋 30 s, 超声 2 min; 6) 离心 10 min (离心半径 8.26 cm, 13 000 r/min, 4℃), 用注射器吸取 150 μl 的上清液, 使用 0.22 μm 的有机相针孔过滤器过滤后, 转移到液相色谱 (LC) 进样小瓶, -80℃ 下保存。

采用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 45℃, 流速: 0.4 ml/min, 进样量 5 μl; 流动相: A, 水 (含 0.1% 甲酸); B, 乙腈/甲醇 (2/3) (v/v) (含 0.1% 甲酸); 梯度洗脱 (0~2 min, 95% A; 2~4 min, 80% A; 4~9 min, 75% A; 9~17 min, 40% A; 17~19 min, 0% A; 19~19.1 min, 0% A; 19.1~20.1 min, 95% A)。质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 样品质谱信

号采集分别采用正负离子扫描模式。通过 LC-MS 上机分析后, 经色谱分离流出的组分不断进入质谱, 质谱连续扫描进行数据采集, 每一次扫描得到一张质谱图, 将每一张质谱图中所有离子强度相加, 得到一个总的离子流强度 (TIC)。

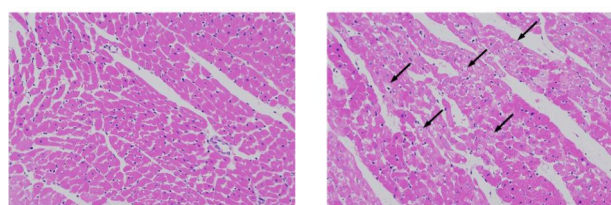
1.5 统计学方法

对代谢组学数据处理软件 Progenesis QI v2.3 解析鉴定出的代谢物进行筛选 (一级质谱精确分子量匹配 20 分, 二级质谱碎片匹配 20 分, 同位素分布匹配 20 分, 筛选条件是三者得分之和 ≥ 50 分) 获得一个二维数据矩阵。利用 SIMCA 14.1 软件对定性后的数据进行多元统计分析, 包括主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA)。采用 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP (VIP > 1) 值结合 Student's *t* 检验的 *P* 值 ($P < 0.05$) 作为差异代谢物的筛选条件。将鉴定出来的差异代谢物名称输入 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 网页进行代谢通路分析, 以 $P < 0.05$ 作为潜在的关键代谢通路的筛选标准。各代谢物的临床诊断价值通过受试者工作特征曲线 (ROC) 下面积 (AUC) 确定。

2 结果

2.1 两组大鼠心肌组织病理学结果

图 1 示, 正常组心肌细胞排列整齐, 细胞形态大小基本一致, 结构清晰, 未见细胞肥大、坏死等现象。与正常组比较, 心血瘀阻证组大鼠心肌细胞淡染, 出现明显的肥大水肿, 肌纤维肿胀, 结构排列紊乱, 细胞间距增大, 并可见炎症细胞浸润。



正常组

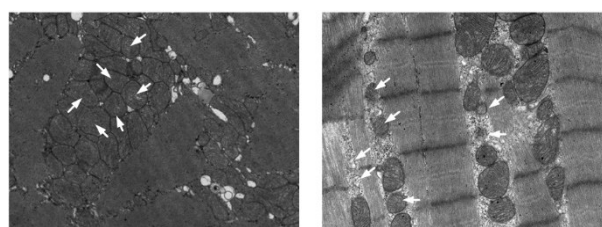
心血瘀阻证组

注: 黑色箭头所指为心肌细胞水肿区域。

图 1 两组大鼠心肌组织形态学 (HE 染色, $\times 200$)

2.2 两组大鼠心肌细胞线粒体形态学结果

图 2 示, 正常组大鼠心肌细胞线粒体排列规则, 大小均匀, 结构完整, 多呈椭圆形, 线粒体嵴结构清晰; 心血瘀阻证组线粒体大小不一, 数量减少, 排列紊乱, 部分线粒体已溶解破裂, 膜结构消失。



正常组

心血瘀阻证组

注: 白色箭头所指为线粒体。

图 2 两组大鼠心肌线粒体超微结构图 (钡铅双染色, $\times 5000$)

2.3 两组大鼠心肌组织正负离子流色谱图结果

以离子强度为纵坐标、时间为横坐标, 绘制出两组大鼠的代表性总离子流色谱图见附图 1、附图 2 (请扫描本文二维码获取), 心血瘀阻证组大鼠总离子流色谱图在离子强度和保留时间上与正常组大鼠不同, 说明两组大鼠的内源性代谢物存在显著差异。

2.4 两组大鼠心肌组织代谢物分析结果

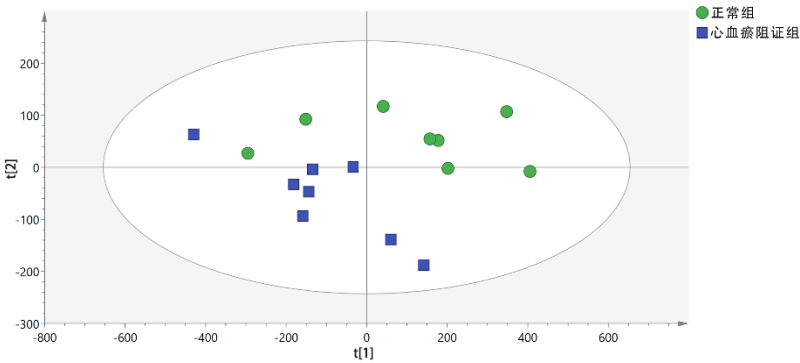
图 3 示, 心血瘀阻证组与正常组样本点处于椭圆置信区间的不同区域内, 空间分布上呈现明显分离趋势, 说明代谢图谱可以有效辨别两组之间的差异。进一步采取有监督的 OPLS-DA 分析, 图 4 示, 两组样本点分别位于不同的象限内, 相互分开互不重叠, 组内样本点聚集更为紧凑。OPLS-DA 模型的可解释变量 R^2X 、 R^2Y 及可预测度 (Q^2) 分别为 0.969、1、0.823, 这些指标越接近 1 表示 OPLS-DA 模型拟合数据效果越好, 进一步说明该模型能很好地解释和预测两组样本之间的差异。

2.5 两组大鼠心肌组织差异代谢物筛选结果

表 1 示, 以 VIP > 1 且 $P < 0.05$ 为筛选条件, 最终得到 19 种组间差异代谢物。与正常组比较, 心血瘀阻证组中磷酸三苯酯、肌苷、TrHA、牛磺酸、泛酸、丙基硫氧嘧啶水平上调; LysoPC [18:2 (9Z, 12Z)]、PE [18:1 (9Z)/0:0]、PE [0:0/18:2 (9Z, 12Z)]、PC [18:2 (2E, 4E)/0:0]、PC [18:2 (9Z, 12Z)/0:0]、PC [18:1 (9Z)/0:0]、PG (16:0/0:0) [U]、L-异亮氨酸、2-羟基肉桂酸、DG [15:1 (9Z)/18:1 (9Z)/0:0] [iso2]、黄嘌呤、甲胺、L-苯丙氨酸水平下调。

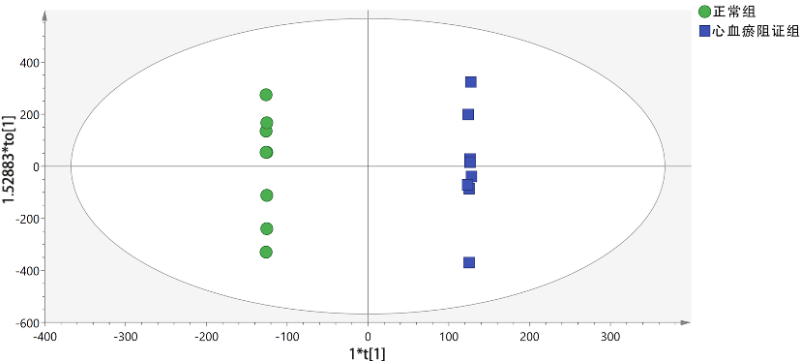
2.6 两组大鼠心肌组织差异代谢物显著代谢通路分析结果

将鉴定出的 19 种差异代谢物的 KEGG 号输入 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 网页的通路分析 (Pathway analysis) 模块, 共鉴定出 10 条代谢通路, 在 $P < 0.05$ 的筛选条件下, 鉴定出富集性较显著的 4 条代谢通路: 苯丙氨酸、酪



注：t [1]，第一预测主成分；t [2]，第二预测主成分。

图3 两组大鼠心肌组织代谢物主成分分析（PCA）得分图



注：t [1]，第一预测主成分；t [2]，第二预测主成分。

图4 两组大鼠心肌组织代谢物正交偏最小二乘法分析（OPLS-DA）得分图

表1 两组大鼠心肌组织 19 种差异代谢物

代谢物名称	VIP	P 值	Log2 (FC) 值	心 血 瘀 阻 证 组
LysoPC [18 : 2 (9Z, 12Z)]	5.210	0.0160	-0.928	↓
PE [18 : 1 (9Z) /0 : 0]	3.928	0.0170	-1.059	↓
磷酸三苯酯	3.057	0.0003	0.476	↑
PE [0 : 0/18 : 2 (9Z, 12Z)]	2.624	0.0425	-0.802	↓
PC [18 : 2 (2E, 4E) /0 : 0]	2.536	0.0410	-0.668	↓
肌昔	2.203	0.0180	0.356	↑
PC [18 : 2 (9Z, 12Z) /0 : 0]	2.006	0.0453	-0.604	↓
PC [18 : 1 (9Z) /0 : 0]	1.910	0.0800	-0.684	↓
TrHA	1.600	0.0004	4.931	↑
PG (16 : 0/0 : 0) [U]	1.593	0.0070	-1.705	↓
牛磺酸	1.444	0.0040	0.340	↑
L-异亮氨酸	1.440	0.0004	-0.623	↓
2-羟基肉桂酸	1.391	1.24531E-05	-0.749	↓
泛酸	1.370	0.0010	0.440	↑
DG [15 : 1 (9Z) /18 : 1 (9Z) /0 : 0] [iso2]	1.215	0.0180	-1.200	↓
黄嘌呤	1.158	0.0500	-0.348	↓
丙基硫氧嘧啶	1.069	2.81761E-07	12.448	↑
甲胺	1.064	0.0070	-0.381	↓
L-苯丙氨酸	1.052	0.0003	-1.458	↓

注：VIP，变量权重值；FC，变异倍数；↑，上调；↓，下调。

氨酸和色氨酸的生物合成，氨酰-tRNA 生物合成，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成，牛磺酸和亚牛磺酸代谢，可作为心 血 瘀 阻 证 作 用 机 制 的 显 著代谢通路，见表 2。

表2 心血瘀阻证组大鼠心肌组织显著代谢通路

通路名称	代谢物 总数	匹配 个数	P 值	Impact 值
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	4	1	0.0237	0.5
氨酰-tRNA 生物合成	48	2	0.0309	0
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	8	1	0.0468	0
牛磺酸和亚牛磺酸代谢	8	1	0.0468	0.4286
嘌呤代谢	66	2	0.0556	0.0322
苯丙氨酸代谢	12	1	0.0695	0.3571
泛酸和辅酶 A 生物合成	19	1	0.1080	0.0071
甘油磷脂代谢	36	1	0.1958	0.0174
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	40	1	0.2153	0
初级胆汁酸生物合成	46	1	0.2437	0.0224

2.7 ROC 曲线预判

由上述结果可知,心血瘀阻证组与正常组比较,最为相关的代谢通路是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,氨酰-tRNA 生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,牛磺酸和亚牛磺酸代谢。将富集在4条主要差异代谢通路上3种差异代谢物作为心血瘀阻证的潜在生物标志物,并利用潜在生物标志物相对定量的浓度数据进行ROC绘图分析,用于冠心病心血瘀阻证诊断的准确性评价。根据Swets的判断标准^[10],AUC>0.9则诊断试验有较高的准确性。结果显示,L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、牛磺酸诊断模型的AUC值分别为0.922、0.953、0.906,这3种差异代谢物曲线下面积说明上述这3种代谢物对冠心病心血瘀阻证预后判断具有较高的预测价值,有望作为标志物单独或者联合用于冠心病心血瘀阻证的早期诊断,详见图5。

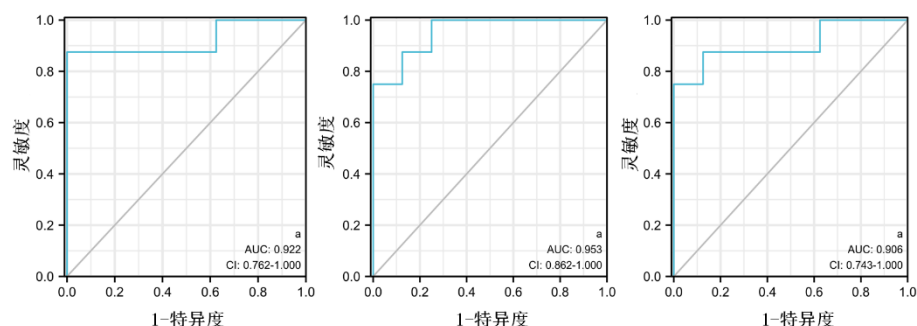
3 讨论

中医证本质的含义是指引起“证”发生、发展

的物质基础,不同中医证候存在着显著差异的代谢产物谱^[11]。冠心病心血瘀阻证是最常见、最主要,也是目前研究最多、最深入的中医证型^[12-13]。本课题组前期研究运用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对大鼠心血瘀阻证模型血浆、尿液等样本进行代谢产物的鉴定,发现心血瘀阻证生物学内涵涉及葡萄糖、氨基酸、脂质三大物质整体代谢失衡^[14]。本研究通过代谢组学的方法对冠心病心血瘀阻证大鼠心肌组织中所有的小分子代谢物进行分析,结果显示,冠心病心血瘀阻证形成时发生明显变化的代谢物共有19个,涉及到氨基酸代谢、脂类代谢和嘌呤代谢等多个层面,其中磷酸三苯酯、肌苷、TrHA、牛磺酸、泛酸、丙基硫氧嘧啶含量升高,其余13个代谢物含量较正常组下调,同时涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,氨酰-tRNA 生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,牛磺酸和亚牛磺酸代谢等多条代谢通路。

本研究造模后期采用ISO反复连续皮下注射,引起慢性心肌缺血。大剂量ISO引起心肌耗氧高于供氧,能量产生受到损害。随着缺氧的发展,应激状态持续存在,心肌需要更多的能量,此时脂肪动员代偿性增强^[15]。溶血磷脂酰胆碱(LPC)是低密度脂蛋白氧化的主要产物,磷脂酶A2(PLA2)水解磷脂酰胆碱(PC)释放LPC^[16]。LysoPC[18:2(9Z,12Z)]包含有亚油酸的部分性质与功能,与氧化损伤、炎症反应有关,可以引起冠状动脉强烈收缩,增加心肌耗氧,扩大心肌梗死范围^[17-18]。脂肪酸的分解促使PC、磷脂酰乙醇胺(PE)等物质被消耗,导致其含量下降^[19]。这反映脂质的吸收与利用障碍进一步恶化,同时也是心肌收缩力下降的标志^[20]。

心脏能源底物的利用随着机体病理状态的不同处于动态变化中^[21]。氨基酸类代谢物在长时间大



注:从左至右依次为L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、牛磺酸的ROC分析图

图5 两组大鼠心肌组织潜在生物标志物的多元化ROC曲线分析

量持续耗能的情况下参与供能。L-异亮氨酸参与了缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成。研究表明, 增强支链氨基酸氧化分解代谢能显著改善患者的心功能^[22]。在心肌缺血、心肌能量供给大幅度下降的情况下, L-异亮氨酸作为糖原氨基酸和生酮氨基酸, 经 α -酮戊二酸转氨后, 可转化为琥珀酰辅酶 A 加入三羧酸循环 (TCA) 中进行氧化, 或转化为草酰乙酸进行糖异生, 产生葡萄糖^[23], 为心肌提供能量补偿, 这也可能是 L-异亮氨酸被大量消耗后含量下降的原因^[24]。氨酰-tRNA 生物合成具有将氨基酸运转到核糖体合成蛋白质的功能^[25]。冠心病心血瘀阻证中, 随着 L-苯丙氨酸和 L-异亮氨酸含量的下降, 氨基酸的转运和代谢将会受到影响, 这在郑景辉教授团队的研究^[26]中得到了证实。L-苯丙氨酸在体内大部分经苯丙氨酸羟化酶作用后生成酪氨酸, 并与酪氨酸一起合成重要的神经递质和激素, 参与机体糖代谢和脂代谢过程^[27]。Wang 等^[28]发现, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成中氨基酸通过脱氨基作用或转氨基作用进入三羧酸循环, 具有促进三磷酸腺苷 (ATP) 产生的作用。进入心血瘀阻证慢性心肌缺血阶段后, 心血瘀阻证组氨基酸水平较正常组下降, 导致三羧酸循环提供的 ATP 减少。在王春玥等^[29]进行的临床样本代谢组学研究发现, 随着冠状动脉病变程度加重, L-苯丙氨酸在正常组、临界组及心肌梗死组水平依次下调, 本研究的实验结果与之一致。苯丙氨酸与冠心病心肌缺血患者心血管疾病发生风险呈负相关^[30]。本研究利用 ROC 曲线诊断评价 AUC 值为 0.922, 提示 L-苯丙氨酸很可能成为冠心病早期诊断的有效标志物和治疗靶点。心脏代谢具有广泛的适应能力和可塑性^[31]。泛酸是生物合成辅酶 A (COA) 和酰基载体蛋白 (ACP) 的前体, 参与脂肪酸代谢过程^[32]。心血瘀阻证组中泛酸的含量上升可能是机体激活泛酸和 COA 合成途径, 提高心肌缺血适应能力, 缓解能量代谢障碍的一种表现。牛磺酸是牛磺酸与亚牛磺酸代谢通路上的关键代谢物, 是一种普遍存在于心肌细胞线粒体中的 β -氨基酸^[33], 主要功能之一是维持线粒体的正常呼吸链。牛磺酸的摄入能够增加线粒体肉碱棕榈酰转移酶 (CPT) 的活性, 参与大鼠脂肪酸氧化和酮体产生^[34]。此外, 牛磺酸含量的升高可以抑制活性氧 (ROS) 的产生, 减轻氧化应激^[35]。本研究结果显示, 心血瘀阻证组线粒体大小不一, 数量减少, 但仍有小部分线粒体维持着较为完整的结构以缓解机

体能量失衡的状态。肌苷作为能量合成的原料, 在细胞缺氧的状态下可继续进行代谢, 维持缺血心肌细胞内 ATP 的合成, 保护心肌功能的完整性^[36]。然而随着心血瘀阻证组肌苷水平的持续升高, 肌苷最终会经核苷磷酸化酶 (PNP) 分解成次黄嘌呤和 1-磷酸核糖生成尿酸, 增加 ROS, 产生炎症的同时诱导氧化应激反应^[16,36], 进一步加重心功能的损伤。本研究 HE 染色结果可见, 心血瘀阻证组大鼠心肌细胞已出现明显的肥大水肿, 肌纤维肿胀, 炎症细胞浸润, 从形态学上佐证了心肌受损、能量代谢失衡的问题。而磷酸三苯酯含量的不断升高将严重扰乱机体全身的综合代谢, 包括脂质代谢和氨基酸代谢^[37]。

综上所述, 在心血瘀阻证慢性心肌缺血情况下, 心肌细胞对能量物质的选用侧重于氨基酸类物质, 氨基酸类代谢物含量下调是心血瘀阻证慢性缺血性心肌损伤重要的特征。L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、牛磺酸作为反映心血瘀阻证特征性的代谢物有望成为心血瘀阻证辨证分型的基础物质, 单独或者联合用于冠心病心血瘀阻证的临床诊断。本研究样本量较少, 后续将在此基础上增加样本数, 结合分子生物学技术以及多种代谢组学检测手段进行相互验证, 进一步完善心血瘀阻证的生物学机制。

参考文献

- [1] 杨光, 何浩强, 董艳, 等. 冠心病痰瘀互结证的组学研究进展与思考[J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 189-194.
- [2] 李杰, 袁肇凯. 冠心病血瘀证的病机研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(7): 613-615.
- [3] 夏世靖. 冠心病血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型的应用研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [4] ZHOU Y, SONG R, MA C, et al. Discovery and validation of potential urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis using a pseudotargeted GC-MS metabolomics method[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20719-20728.
- [5] 朱爽, 王阶, 胡坤, 等. 代谢组学技术在中医证方药中的应用[J]. 吉林中医药, 2019, 39(11): 1537-1540.
- [6] WEISSMAN J. Guide to yeast genetics : functional genomics, proteomics, and other systems analysis [M]. California, USA: Academic Press, 2010: 395.
- [7] 简维雄, 左和宁, 袁肇凯, 等. 心血瘀阻证动态演变过程大鼠模型的建立及方证验证评价[J]. 中医杂志, 2015, 56(16): 1420-1424.
- [8] 孙安会. 冠心病血瘀证病因病势对心肌细胞能量代谢及病证网络模型的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学,

- 2016.
- [9]陈清华,明荷,袁肇凯,等. 丹参酮ⅡA对心血瘀阻证大鼠模型心电图和心肌HBFP染色的影响[J]. 中华中医药学刊,2008,26(8):1682-1683.
- [10]SWETS JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems [J]. Science, 1988,240(4857):1285-1293.
- [11]高扬,张安晶,胡元会. 代谢组学在中医证候研究中的应用进展[J]. 中国中医基础医学杂志,2013,19(6):710-712,716.
- [12]邢亚楠,杨冠华,刘苏宁,等. 冠心病血瘀证研究概述[J]. 中国医药导报,2009,6(2):5-7.
- [13]XIONG XJ, WANG Z, WANG J. Innovative strategy in treating angina pectoris with Chinese patent medicines by promoting blood circulation and removing blood stasis: experience from combination therapy in Chinese medicine [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(4):540-553.
- [14]简维雄,袁肇凯. 再论代谢组学与证候的相关性研究[J]. 中医杂志,2012,53(3):181-184.
- [15]孙安会. 冠心病血瘀证病因病势对心肌细胞能量代谢及病证网络模型的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2016.
- [16]LIU Y, ZHANG X, GUAN T, et al. Effects of quercetin on cadmium-induced toxicity in rat urine using metabolomics techniques[J]. Hum Exp Toxicol, 2020,39(4):524-536.
- [17]于牡丹. 蒙药八味沉香散对AMI模型大鼠和正常大鼠血浆代谢组学研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学,2017.
- [18]许文轩. 大鼠心肌缺血后适应代谢轮廓变化研究[D]. 天津:天津医科大学,2018.
- [19]郑景辉,陈建军,简维雄,等. 冠心病心血瘀阻证患者血浆代谢组学的通路分析[J]. 时珍国医国药,2015,26(2):485-487.
- [20]刘婕. 基于UPLC-MS的冠心病患者血清代谢轮廓研究[D]. 天津:天津医科大学,2014.
- [21]刘媛媛. 不同强度跑台运动对大鼠心肌线粒体底物应用的影响及分子机制[D]. 石家庄:河北北方学院,2015.
- [22]付阳,李梦,孙小沛,等. 增强支链氨基酸氧化代谢改善心力衰竭患者心功能[J]. 临床心血管病杂志,2020,36(3):219-222.
- [23]张印. 基于代谢组学探讨2型糖尿病进展并发高血压患者血清代谢标志物的研究[D]. 宜春:宜春学院,2019.
- [24]尹春园,孙明谦,金龙,等. 基于液相色谱-质谱联用技术的心肌缺血大鼠血清和心肌组织代谢组学[J]. 色谱,2020,38(2):206-211.
- [25]沈宁,俞亚东,杨贝,等. 人色氨酸-tRNA合成酶的结构和功能的研究[C]//中国生物化学与分子生物学会. 中国蛋白质组学第三届学术大会论文摘要. 长春:中国生物化学与分子生物学会,2005:30.
- [26]郑景辉,伍新诚,陈建军,等. 冠心病血瘀证患者代谢组学生物信息学分析[J]. 中华中医药学刊,2017,35(11):2794-2797.
- [27]付俊玲. 青少年发病的成人型糖尿病2型和3型临床诊断模型的构建和代谢组学研究[D]. 北京:北京协和医学院,2020.
- [28]WANG C, LIU C, WANG M, et al. UPLC-HRMS-Based plasma metabolomic profiling of novel biomarkers by treatment with KDZI in cerebral ischemia reperfusion rats[J]. Molecules, 2018,23(6):1315.
- [29]王春玥,宋晨曦,张睿,等. 冠心病不同进展阶段患者代谢差异初步分析[J]. 中国循环杂志,2020,35(12):1192-1195.
- [30]WU YJ, BOND M, SALA-NEWBY GB, et al. Altered S-phase kinase-associated protein-2 levels are a major mediator of cyclic nucleotide-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Circ Res, 2006,98(9):1141-1150.
- [31]TUOMAINEN T, TAVI P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure[J]. Exp Cell Res, 2017,360(1):12-18.
- [32]梁华,闫起,隋雨桐,等. 六味地黄丸对自然衰老小鼠调节作用的代谢组学研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(5):2-7.
- [33]SCHAFFER SW, SHIMADA-TAKAURA K, JONG CJ, et al. Impaired energy metabolism of the taurine-deficient heart[J]. Amino Acids, 2016,48(2):549-558.
- [34]MURAKAMI S, ONO A, KAWASAKI A, et al. Taurine attenuates the development of hepatic steatosis through the inhibition of oxidative stress in a model of nonalcoholic fatty liver disease in vivo and in vitro [J]. Amino Acids, 2018,50(9):1279-1288.
- [35]王立英. 牛磺酸抑制心肌成纤维细胞的增殖作用及机制研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [36]马全瑞. 肌苷对化学性缺氧损伤的少突胶质细胞保护作用的研究[D]. 西安:第四军医大学,2011.
- [37]胡维,王姝,于海兵,等. 磷酸三苯酯致大鼠肝脏代谢紊乱的生物信息学分析[J]. 环境与职业医学,2020,37(2):111-120.

Myocardial Metabolomics in Rats with Coronary Heart Disease and Blood Stasis Obstruction Syndrome

ZHOU Manli, QIAN Shule, HU Yilei, MA Zhiyan, GAO Linwei, JIAN Weixiong

School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

ABSTRACT Objective To explore the potential biological basis of coronary heart disease (CHD) with heart-blood stasis obstruction syndrome by using metabolomics. **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into normal group (8 rats) and the heart-blood stasis obstruction syndrome group (12 rats). The model of CHD with heart-blood stasis obstruction syndrome was prepared by high-fat diet combined with vitamin D3 and subcutaneous injection of isoproterenol. The changes of cardiac histomorphology and mitochondrial ultrastructure of cardiomyocytes were observed. The myocardial tissue samples of rats were collected for metabolomics research using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The differential metabolites between the groups were screened through principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), and the related metabolic pathways were analyzed. **Results** The cardiomyocytes in the normal group were arranged orderly and the structure was clear, with regularly arranged and complete mitochondria. Cardiac myocyte hypertrophy, muscle fibers swelling, and inflammatory cell infiltration were observed in the heart blood stasis obstruction syndrome group, with decreased and disorderly arranged mitochondria in different sizes, as well as certain dissolved and ruptured mitochondria and disappeared membrane structure. The endogenous metabolites of rats in both groups were significantly different, and 19 differential metabolites were detected. The rats in the heart blood stasis obstruction syndrome group had increased expression levels of triphenyl phosphate, inosine, TrHA, taurine, pantothenic acid and propylthiouracil, as well as decreased expression of LysoPC[18:2(9Z,12Z)], PE[18:1(9Z)/0:0], PE[0:0/18:2(9Z,12Z)], PC[18:2(2E,4E)/0:0], PC[18:2(9Z,12Z)/0:0], PC[18:1(9Z)/0:0], PG(16:0/0:0)[U], L-isoleucine, 2-hydroxycinnamic acid, DG[15:1(9Z)/18:1(9Z)/0:0][iso2], xanthine, methylamine, and L-phenylalanine Acid than those in the normal group. Multiple metabolic pathways were involved such as phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, aminoacyl tRNA biosynthesis, valine, leucine and isoleucine biosynthesis, taurine and taurine metabolism. The ROC results showed that the three differential metabolites including L-phenylalanine, L-isoleucine and taurine had a high predictive value for prognosis of CHD with heart blood stasis obstruction syndrome. **Conclusion** The myocardial metabolites of CHD rats with heart blood stasis obstruction syndrome mainly involve amino acid metabolism, lipid metabolism and purine metabolism. Three metabolites including L-phenylalanine, L-isoleucine and taurine, alone or in combination, are expected to be used as markers for the early diagnosis of CHD with heart and blood stasis obstruction syndrome.

Keywords coronary heart disease; heart blood stasis obstruction syndrome; metabolomics; myocardial tissue; L-phenylalanine; L-isoleucine; taurine

(收稿日期: 2021-08-19; 修回日期: 2022-01-17)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每本 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元, 2018 年(缺 5、7、9 期)每册 20 元, 2020 年(缺 7、8、9 期)每册 20 元, 2021 年每册 20 元。2011—2013 年合订本每年 4 本, 全年 280 元, 2014—2017 年合订本每年 4 本(缺 2017 年上半年合订本), 全年 400 元, 2018—2021 年合订本, 每年 4 本, 全年 600 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信(zyzgzzh)购买。邮编: 100700, 电话: (010)64089195。