

基于代谢组学的心血瘀阻证动态演变过程研究

简维雄¹ 左和宁² 刘 韶³ 李 杰¹ 胡志希¹ 孙贵香¹ 袁肇凯¹

摘要 目的 研究心血瘀阻证形成过程的代谢产物组学的变化。**方法** 采用高脂饲料与冠状动脉左前降支结扎术结合的方法,制备大鼠心血瘀阻证形成的 3 个阶段。以血脂增高为血瘀证前期组,动脉粥样硬化形成亚血瘀证期组,动脉粥样硬化基础之上结扎冠状动脉为心血瘀阻证组,每组 8 只。另取 24 只大鼠作为空白对照组,每个阶段 8 只。应用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS),对不同组之间代谢产物含量的变化进行主成分分析(principal component analysis, PCA)及偏最小二乘法分析(partial least squares method, PLS)。**结果** (1)在鉴定出的 32 中代谢产物中与心血瘀阻证形成过程密切相关依次是柠檬酸、胆固醇、肌醇、鸟氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、硬脂酸、乳酸、尿素、亮氨酸、亚油酸、甘露糖。(2)3 个阶段代谢标志物,血瘀证前期:硬脂酸、乳酸(正相关),甘露糖(负相关);亚血瘀证期:鸟氨酸、脯氨酸、肌醇(正相关),异亮氨酸(负相关);心血瘀阻证:亮氨酸、异亮氨酸、柠檬酸(正相关)、乳酸(负相关)。**结论** 血瘀证前期高脂饮食引起体内脂质代谢紊乱,机体启动抗炎;亚血瘀证期持续高脂饮食所导致的尿素循环紊乱、肠道菌群失调、血管形态改变、肝脏功能障碍;心血瘀阻期急性心肌缺血后引起的糖代谢障碍。

关键词 心血瘀阻证;演变过程;代谢组学

Research on Dynamic Evolution of Blockade of Heart Vessel Syndrome Based on Metabonomics
JIAN Wei-xiong¹, ZUO He-ning², LIU Shao³, LI Jie¹, HU Zhi-xi¹, SUN Gui-xiang¹, and YUAN Zhao-kai¹
1 Institute of TCM Diagnostics, Hunan University of TCM, Key Lab of Hunan Province, Cooperative Innovation Center for Digital TCM, National Key Discipline of TCM Diagnostics, Hunan University of TCM, Changsha (410208); 2 Department of Testing, First Hospital Affiliated to Hunan University of TCM, Changsha (410007); 3 Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410008)

ABSTRACT Objective To observe the changes of metabolomics in the evolution process of blockade of heart vessel syndrome (BHVS). **Methods** The formation of BHVS in three stages were simulated by using high-fat forage and ligating the left anterior descending coronary artery. Increased blood lipid was in the early stage of blood stasis syndrome (BSS) group. Atherosclerosis (AS) was formed in the middle stage of BSS group (sub-BSS). Coronary artery was ligated on the basis of AS was the 3rd stage of BSS (BHVS group). There were 8 rats in each group. Totally 24 rats was used as the blank control group and each stage had 8 rats. The changes of metabolite contents were analyzed using principal component analysis (PCA) and partial least squares method (PLS) with gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) among different groups. **Results** (1) In the 32 kinds of identified metabolites, citric acid was closest associated with the evolution process of BHVS, followed by cholesterol, inositol, ornithine, proline, isoleucine, octadecanoic acid, lactic acid, urea, leucine, linoleic acid, mannose. (2) Metabolic markers in the three stages: octadecanoic acid, lactic acid (positively correlated), and man-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81202647, 81273670);教育部博士点科研基金优先发展资助项目(No. 20124323130001);教育部博士点基金资助项目(No. 201114323120001);湖南省自然科学基金资助项目(No. 12JJ4081);湖南省优秀博士学位论文资助项目(No. YB2011B037);中国博士后基金资助项目(No. 2013M530355)

作者单位:1.湖南中医药大学中医诊断研究所,湖南省重点实验室,数字中医药协同创新中心,湖南中医药大学国家重点学科中医诊断学(长沙 410208);2.湖南中医药大学第一附属医院检验科(长沙 410007);3.中南大学湘雅医院药学部(长沙 410008)

通讯作者:袁肇凯, Tel:0731-85381147, E-mail: yuanzk1520@aliyun.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.12.1496

nose (negatively correlated) in the early stage of BSS. Ornithine, proline, inositol (positively correlated), and isoleucine (negatively correlated) in the middle stage of BSS (sub-BSS). Leucine, isoleucine, citric acid (positively correlated), and lactic acid (negatively correlated) in the BHVS stage. Conclusions High fat diet causes disordered *in vivo* lipid metabolism in pre-stage BSS, and the organism initiates anti-inflammation. Continued high fat diet leads to disordered urea cycle, imbalanced intestinal flora, changed vascular morphology, and liver dysfunction in the sub-BSS stage. Acute myocardial ischemia leads to glucose metabolism disorder in the BHVS stage.

KEYWORDS blockade of heart vessel syndrome; dynamic evolution; metabonomics

证从起始到形成,各个要素(病因、病机、病位、病性、病势等)是不断变化的,具有流动的特征,因此有学者提出证是动态变化的^[1]。就心血瘀阻证的形成过程本课题组通过高脂饲料喂养法与左前降冠状动脉结扎法模拟血瘀证前期、亚血瘀证期、心血瘀阻证期 3 个阶段,已从由痰致瘀角度进行了初步研究,并应用方证验证确定该模型具备血瘀证特点^[2]。为了进一步探索高脂饮食、以及心肌缺血后机体能量代谢变化,本项目应用代谢组学技术进行了不同阶段小分子代谢产物的研究,以期从脂肪酸、氨基酸、糖类三大物质代谢角度解释其生物学机制。

材料与方法

1 动物 110 只清洁级 SD 健康大鼠,体重(250±20)g,雄性,由湖南斯莱克景大实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。在人工调控的环境中饲养 22~26℃,自由饮水和进食饲养 1 周后用于实验。

2 主要试剂及仪器 主要试剂:胆固醇(500 g,北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:18410545);牛胆酸钠(25 g,北京奥博星生物技术有限公司,批号:20111012);维生素 D3 注射液(1 mL,上海通用药业股份有限公司,批号:H31021404);丙硫氧嘧啶片(50 mg/片,南通精华制药股份有限公司,批号:H32020795);甲醇(500 mL 色谱级,湖南化工研究院,批号:1332103);吡啶(500 mL 色谱级,天津定光精细化工研究所,批号:051123);三氯甲烷(500 mL 色谱级,长沙湘科精细化工厂,批号:040729);17 碳脂肪酸甲氧胺(美国 Sigma 试剂公司,批号:14907129),甲氧胺(美国 Sigma 试剂公司,批号:037K1589)。主要仪器:S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);3k18 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司);7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪(Agilent 公司)。

3 造模及分组 24 只大鼠作为空白对照组,86 只大鼠用于制备动物模型。造模方式及模型评价体系均参照参考文献[3],分 3 个阶段复制大鼠模型。第一阶段,“血瘀证前期”大鼠模型的建立:首先复制动脉粥样硬化大鼠模型,高脂饲养法。饲料配制: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,压制成高脂饲料饲喂,7 天后注射维生素 D3 注射液(50 万 IU/kg),14 天后再注射维生素 D3 注射液(20 万 IU/kg)。在造模第 3 周,选取空白组 8 只大鼠检测血脂、血液流变学指标,以空白组数值 95% 参考值范围作为正常值。造模大鼠随机选取 3 只与空白组比较,血脂、血液流变学血浆黏度和全血黏度中的一项高于正常值,作为“血瘀证前期”模型成功标志。随机选取 8 只大鼠腹主动脉采血。第一阶段造模无大鼠死亡。

第二阶段:“亚血瘀证期”大鼠模型的建立:将第一阶段成模大鼠在第 12 周,随机抽取 3 只大鼠,取主动脉进行 HE 染色检测,以大鼠主动脉动脉斑块形成、血液流变学指标持续增高为模型成功标志(8 只“血瘀证前期”模型血液流变学数值 95% 参考值范围)。随机选取 8 只大鼠腹主动脉采血。同时选取 8 只正常大鼠采集上述指标以作对照。第二阶段造模 7 只大鼠死亡。

第三阶段:“心血瘀阻证期”大鼠模型的建立:在第二阶段的基础上,造模:(1)大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉(0.4~0.6 mL/100 g 大鼠),即时记录标准 II 导联心电图;(2)气管切开后接人工呼吸机辅助呼吸(呼吸机的潮气量为 8~12 mL,频率 80 次/min,呼吸比为 1:2);在距胸骨左缘 0.5 cm,第 3~4 肋骨间作一约 3 cm 的纵行切口,从左侧第 4 肋间钝性分离皮肤、胸大肌、前锯肌,打开胸腔,用自制小拉钩拉开 3、4 肋,显示约 1.2 cm 的手术视野,暴露心脏,剪开心包,在肺动脉圆锥与左心耳交界稍下 1~2 mm 处用无创缝合线穿线,即时记录标准 II 导联心电图;(3)结扎冠状动脉左前降支,即时记录标准 II 导联心电图;以穿线

而未结扎者作为假手术大鼠;以结扎部位以下心肌变白、搏动减弱且心电图出现 ST 段弓背向上明显抬高为造模成功大鼠;(4)逐层缝合胸壁。左冠状动脉穿线不结扎为假手术组。模型组 8 只。同期选取 8 只正常大鼠采集上述指标以作对照。第三阶段造模 25 只大鼠死亡。最终造模成功为 54 只大鼠,成模率约为 63%。

最终组别:空白对照组 3 个阶段 24 只(第 1 阶段正常组:与血瘀证前期对照 8 只;第 2 阶段正常组:亚血瘀证期对照 8 只;第 3 阶段正常组:心血瘀阻证期对照 8 只),血瘀证前期组 8 只,亚血瘀证期组 8 只,心血瘀阻证期组 8 只,另有 16 只用于其他项目研究。假手术组 5 只(原 8 只,3 只衍生化时失败)。

4 GC-MS 样本预处理 样品解冻后取 100 μL 血清于 1.5 mL EP 管中,加入 400 μL 甲醇,随后加入 1 mg/mL 十七烷酸溶液(甲醇作溶剂)30 μL 作为内标,置于涡旋振荡仪混合 1 min,冰浴 10 min 后进行高速离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 r/min, 10 min),取出 400 μL 上清液于玻璃离心管中,常温下氮气吹干。吹干后样品中加入 15 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液 50 μL ,混匀,封口后置于水浴锅中 70 $^{\circ}\text{C}$ 下脲化 1 h,反应完成后再加入衍生化试剂 100 μL (BSTFA + TMCS = 99:1),混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 1 h 后取上清液到微量进样管,供 GC-MS 分析。

5 GC-MS 分析条件 色谱条件:色谱柱为 AgilentHP-5MS(30 m $\times$ 0.25 μm $\times$ 0.25 mm),进样口温度:280 $^{\circ}\text{C}$,分流比为 10:1,程序升温:初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$ (保持 3 min),以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$ (保持 8 min),进样量:1 μL ,载气:高纯氦气(99.999%),柱流速:1.0 mL/min。质谱条件:离子源温度:150 $^{\circ}\text{C}$,四级杆温度:230 $^{\circ}\text{C}$,接口温度:280 $^{\circ}\text{C}$,电离电压:70 eV,采用全扫描模式,扫描范围:30 ~ 800 m/z,溶剂延迟 3 min。代谢物鉴定:利用质谱数据库对共有的内源性代谢物作鉴定,以通常匹配度大于 80% 的鉴定结果作为较为可信的物质。

6 统计学方法 根据 GC-MS 总离子流图中各峰的保留时间挑选共有峰(各图谱中共有的色谱峰),获取各峰与内标峰的峰面积数据,用相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的含量。主要成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法分析(partial least squares method, PLS)应用 SIMCA-2P 11.5 软件。采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经正态性、方差齐性检验后,方差齐多组间样本比较采用单因素单变量

方差分析 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 GC-MS 分析结果 大鼠血浆 GC-MS 分析总离子流图如图 1 所示。

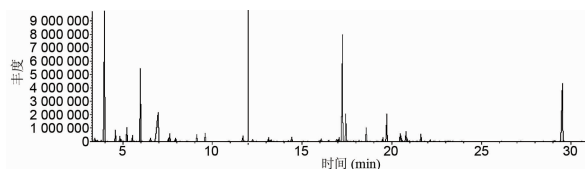


图 1 血浆 GC-MS 分析总离子流

代谢物鉴定:利用安捷伦自带质谱数据库对共有的内源性代谢物作鉴定,以通常匹配度大于 80% 的鉴定结果作为较为可信的物质。挑选后共有峰后发现血浆内共有内源性代谢物 32 种,依据保留时间分别为见表 1。

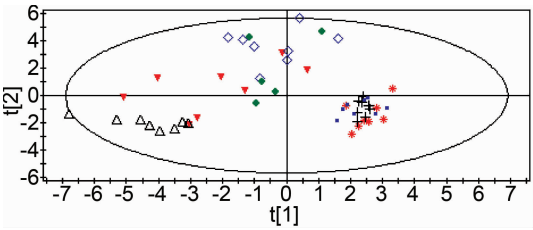
2 各组大鼠血浆 PLS-DA 将血浆 32 种代谢产物通过 PCA,进行第 1 阶段正常组,第 2 阶段正常组,第 3 阶段正常组,血瘀证前期组,亚血瘀证期组,心血瘀阻证组,假手术组 7 组模式识别(图 2,3)。结果显示:第 1 阶段正常组,第 2 阶段正常组,第 3 阶段正常组集中分布在得分图左下方,血瘀证前期组、亚血瘀证期组、心血瘀阻证期和假手术组集中分布在得分图右侧及上方;假手术组与心血瘀阻证期组呈现出良好的分离。血瘀证前期组与亚血瘀证期组、心血瘀阻证期组分别存在交混,为此继续 PLS 建立判别模型(图 4),判别模型显示对组别的解释为 0.8626 达到一个较高的精度,证明模型建立是合理的,模型显示血瘀证前期组、亚血瘀证期组、心血瘀阻证期三组间存在明显离散,不属于一类。提示:造模的方式是引起分布不同的主要因素,与造模的时间无关。

变量 VIP 图(选取 > 1)(图 5),显示各变量与造模方式密切度依次是柠檬酸、胆固醇、肌醇、鸟氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、硬脂酸、乳酸、尿素、亮氨酸、亚油酸、甘露糖。结合因子载荷图(图 3),以上 12 种代谢产物在正常组、血瘀证前期组、亚血瘀证组、心血瘀阻证组 4 组代谢标志物变化趋势为图 6 ~ 9 中所示。

3 4 组差异代谢产物比较 对影响正常组、血瘀证前期组、亚血瘀证组、心血瘀阻证组四组变化的 12 种代谢产物采用单因素方差分析,确定相对含量差异性。结果显示各代谢产物水平呈现不同的差异性(表 2),在不同阶段呈现相应的变化趋势(表 3),柠檬酸水平呈现持续增高趋势;胆固醇、硬脂酸水平在 3 个

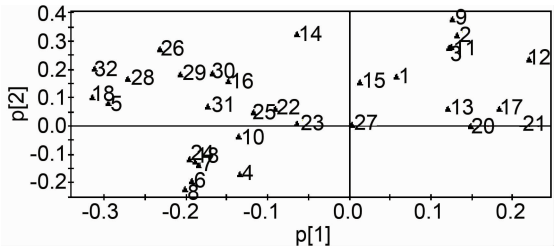
表 1 血浆内源性代谢产物鉴定表

编号	保留时间(min)	化合物名称	代谢产物	匹配度
1	3.955	Propanoic acid	乳酸	90
2	4.590	L-Alanine	丙氨酸	90
3	4.839	Glycine	甘氨酸	83
4	5.530	(R)-3-Hydroxybutyric acid	γ -羟基丁酸	91
5	5.988	Urea	尿素	90
6	6.539	L-Valine	L-缬氨酸	89
同5	6.988	Urea	尿素	90
7	7.535	L-Leucine	亮氨酸	90
8	7.921	L-Isoleucine	异亮氨酸	83
9	7.963	L-Proline	脯氨酸	90
同3	8.138	Glycine	甘氨酸	80
10	8.203	Butanedioic acid	琥珀酸	93
11	9.125	Serine	丝氨酸	90
12	9.591	L-threonine	苏氨酸	90
同9	11.808	L-Proline	脯氨酸	90
13	12.248	Creatinine enol	肌酐烯醇	94
14	13.115	L-Ornithine	鸟氨酸	95
15	13.201	Glutamine	谷氨酰胺	88
16	13.269	phenylalanine	苯丙氨酸	90
17	14.428	L-Lysine	赖氨酸	94
同14	15.968	L-Ornithine	鸟氨酸	96
18	16.070	Citric acid	柠檬酸	91
19	17.112	Galactopyranose	吡喃(型)半乳糖	91
20	17.233	d-Glucose	葡萄糖	83
21	17.444	d-Mannose	甘露糖	80
22	17.492	L-Tyrosine	L-酪氨酸	90
23	17.869	Gluconic acid	葡萄糖酸	90
24	18.209	Glucopyranose	吡喃葡萄糖	90
25	18.578	Hexadecanoic acid	棕榈酸	96
26	19.494	Inositol	肌醇	83
27	19.549	Uric acid	尿酸	90
28	20.46	9,12-Octadecadienoic acid	亚油酸	99
29	20.513	Oleic acid	油酸	99
同29	20.585	trans-13-Octadecenoic acid	反式13-十八碳烯酸	96
30	20.787	Octadecanoic acid	硬脂酸	96
31	22.140	Arachidonic acid	花生四烯酸	86
32	29.512	Cholesterol	胆固醇	81
内标	19.711	Heptadecanoic acid	十七烷酸	90



注：* 为第 1 阶段正常组；+ 为第 2 阶段正常组；· 为第 3 阶段正常组；▼ 为血瘀证前期组；◇ 为亚血瘀证组；△ 为心血瘀阻证组；◆ 为假手术组；t[1] 第一主成分，t[2] 第二主成分；图 4 同

图 2 各组大鼠血浆 7 组样本得分图



注：p[1] 第一主成分，p[2] 第二主成分
图 3 各组大鼠血浆 7 组因子载荷图

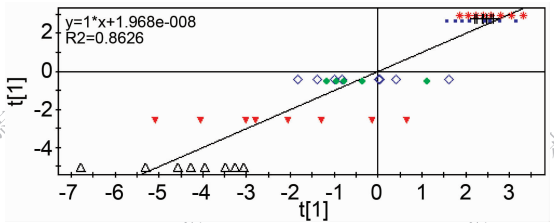


图 4 各组大鼠血浆 7 组样本得分图

阶段都增高；肌醇水平在 3 个阶段都增高但以亚血瘀证期明显；鸟氨酸水平仅在亚血瘀证期增高；脯氨酸水平在亚血瘀证期增高在心血瘀阻证期又呈现下调趋势；异亮氨酸水平在亚血瘀证期下调后，在血瘀阻证期

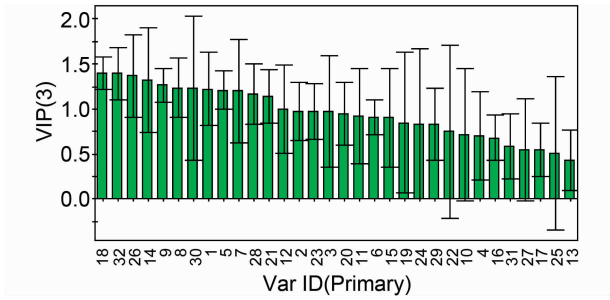


图 5 大鼠血浆自变量 VIP

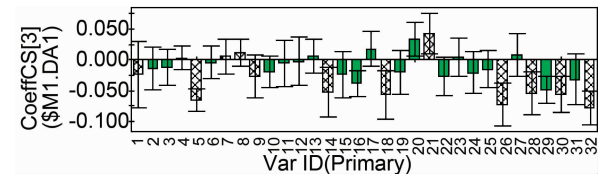


图 6 正常组自变量系数

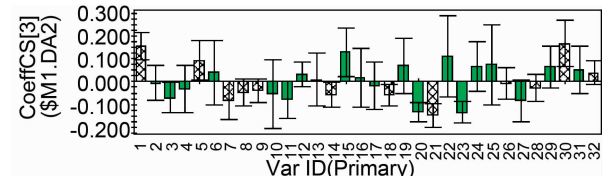


图 7 血瘀证前期组自变量系数

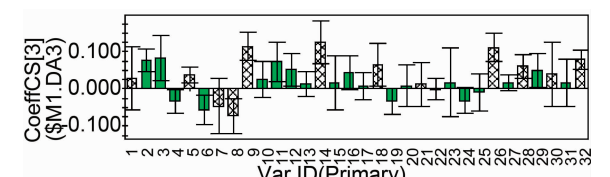


图 8 亚血瘀证组自变量系数图

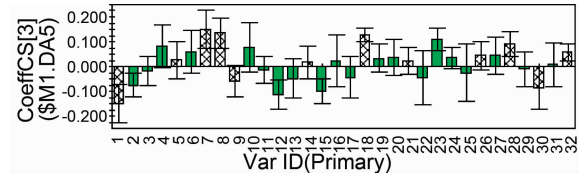


图 9 心血瘀阻证组自变量系数

又呈现上调趋势;乳酸水平在血瘀证前期和亚血瘀证期增高,心血瘀阻证期下调;尿素水平在血瘀证前期与心血瘀阻证期显著上调,亮氨酸水平仅在心血瘀阻证期上调;亚油酸水平在三阶段都上调,但在心血瘀阻证期较为显著;甘露糖水平在血瘀证前期下调,亚血瘀证期、心血瘀阻证期稍有上调,但仍然低于正常水平。将因子载荷图、变量 VIP 图、自变量系数图三者结合在一起,选取共性因子确定血瘀证形成过程中各阶段代谢标志物。血瘀证前期:硬脂酸、乳酸(正相关),甘露糖(负相关)。亚血瘀证期鸟氨酸、脯氨酸、肌醇(正相关),异亮氨酸(负相关)。心血瘀阻证:亮氨酸、异亮氨酸、柠檬酸(正相关)、乳酸(负相关)。

讨 论

代谢组学技术目前已广泛应用于药物研发、临床诊断、病理机制等领域,在诠释中医理论及分析中药作用机理等方面发挥了独特的作用^[4]。就心血瘀阻证已有学者从动脉粥样硬化大鼠研究了由痰致瘀的机体代谢过程变化^[5],也有从急性心肌缺血研究了机体代谢过程变化^[6],但冠心病病理演变过程是一个高脂血症→动脉粥样硬化→心肌缺血的过程,同时具备动脉粥样硬化、急性心肌缺血的共同特征,这种病理特征的代谢产物具备何种特征改变是本项目研究的内容。

表 2 4 组间差异代谢产物比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

项目	正常组	血瘀证前期组	亚血瘀证组	心血瘀阻证组
柠檬酸	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.03 *▲	0.13 ± 0.03 *△	0.17 ± 0.03 *△▲
胆固醇	0.53 ± 0.12	3.78 ± 0.83 *	4.37 ± 0.26 *	4.01 ± 0.88 *
肌醇	0.08 ± 0.02	0.19 ± 0.06 *▲	0.27 ± 0.05 *▲	0.21 ± 0.05 *
鸟氨酸	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.04 *	0.20 ± 0.04 *△	0.13 ± 0.04 *▲
脯氨酸	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.08	0.29 ± 0.08 *△	0.07 ± 0.03 *▲
异亮氨酸	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01 △	0.10 ± 0.02 *△▲
硬脂酸	0.36 ± 0.02	0.49 ± 0.09 *	0.46 ± 0.07 *	0.49 ± 0.07 *
乳酸	3.70 ± 1.00	4.55 ± 0.78	4.37 ± 0.86	2.73 ± 0.66 *△▲
尿素	2.26 ± 0.52	7.58 ± 2.81 *	5.56 ± 1.01 *△▲	7.31 ± 2.21 *
亮氨酸	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.18 ± 0.05 *△▲
亚油酸	0.15 ± 0.05	0.31 ± 0.09 *	0.35 ± 0.09 *	0.42 ± 0.14 *△
甘露糖	3.09 ± 0.65	1.48 ± 0.71 *	2.69 ± 0.74 △	2.04 ± 0.82 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与血瘀证前期组比较,△ $P < 0.05$;与亚血瘀证组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 4 组间差异代谢产物比较趋势变化

项目	途径	正常组	血瘀证前期组	亚血瘀证组	心血瘀阻证组
柠檬酸	三羧酸循环	—	↑	↑↑	↑↑↑
胆固醇	脂肪的消化和吸收	—	↑	↑	↑
肌醇	肌醇磷酸代谢	—	↑	↑↑	↑
鸟氨酸	鸟氨酸循环	—	—	↑	—
脯氨酸	氨基酸生物合成	—	—	↑	↓
异亮氨酸	支链氨基酸降解	—	—	↓	↑
硬脂酸	脂肪的消化和吸收	—	↑	↑	↑
乳酸	糖酵解/糖异生	—	↑	↑	↓
尿素	鸟氨酸循环	—	↑↑↑	↑	↑↑↑
亮氨酸	支链氨基酸降解	—	—	—	↑
亚油酸	脂肪的消化和吸收	—	↑	↑	↑↑
甘露糖	溶酶体	—	↓↓	↓	↓

注: ↑ 为与正常组比较, 差异有统计学意义; ↑↑ 为与血瘀证前期组比较, 差异有统计学意义; ↑↑↑ 与亚血瘀证组比较, 差异有统计学意义; ↓ 为与正常组比较, 差异有统计学意义; ↓↓ 与亚血瘀证组、心血瘀阻证组比较, 差异有统计学意义

依据 PCA 结论, 研究发现影响正常→血瘀证前期→亚血瘀证期→心血瘀阻证期变化过程的重要因子依次为柠檬酸、胆固醇、肌醇、鸟氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、硬脂酸、乳酸、尿素、亮氨酸、亚油酸、甘露糖。血瘀证形成过程中各阶段代谢标志物, 血瘀证前期: 硬脂酸、乳酸(正相关), 甘露糖(负相关)。亚血瘀证期鸟氨酸、脯氨酸、肌醇(正相关), 异亮氨酸(负相关)。心血瘀阻证: 亮氨酸、异亮氨酸、柠檬酸(正相关)、乳酸(负相关)。

该模型首先采用高脂饲料喂养, 饲料中含有胆固醇、猪油, 为此脂质代谢紊乱是起始动因, 从而表现为胆固醇、硬脂酸、亚油酸增高。其中胆固醇在继续高脂饲料喂养大鼠中呈进行性增高, 这将导致动脉血管内皮细胞持续性受损, 发展成为动脉粥样硬化^[7], 而居高不下的硬脂酸也促进这一病理过程^[8]。

柠檬酸是三羧酸循环的中间产物, 可能是在体内蓄积血脂增高导致脂肪酸-β-氧化增强, 生成大量的乙酰辅酶 A, 这将增加柠檬酸含量^[9], 其后在心血瘀阻证期心肌组织急剧的缺血缺氧, 心肌收缩力下降, 组织灌流量不足引发各组织器官生命活动所需能量(ATP)不足。由于组织中 ATP 相对不足, 故柠檬酸循环加强, 表现为血中柠檬酸含量的在亚血瘀证期的基础之上进一步增高, 呈三阶段持续增高趋势^[10]。

肌醇在血瘀证前期组, 亚血瘀证组持续性增高, 这与长期高脂饮食后大鼠出现高脂血症, 胰腺组织出现病理损伤, 三磷酸肌醇(inositol triphosphate; IP3) 信号通路发生变化, 导致 IP3 表达增高, IP3 则可在多次水解作用下转变成肌醇^[11,12]。而肌醇又在心血瘀阻证组水平下调, 因肌醇具有降低胆固醇的作用, 可能与促进脂肪代谢, 改善脂肪的吸收与利用有关^[13]。

鸟氨酸、尿素水平上调, 说明大鼠葡萄糖代谢受损,

氨基酸的氧化便成为重要的替代能源, 氨基酸的生糖、生酮作用增强, 同时尿素循环出现异常^[14]。尿素水平在心血瘀阻证形成过程的三个阶段水平上调, 但具有次第下调的特点。因为高脂食物可以导致通过诱导氧化应激引起肠道菌群失调^[15], 有研究证实调节肠道菌群后可以降低血尿素水平^[16], 为此在喂养高脂饲料的血瘀证前期可能由于肠道菌群失调而导致血清尿素上调。本课题组以往研究发现尿素在心血瘀阻时水平会显著上调, 而本项研究却发现心血瘀阻证形成时尿素水平并未上调, 反而继续下调, 可能是持续高脂状态导致肝功能的受损, 血清尿素水平呈现的一种变化^[17]。

脯氨酸是一种脂肪族氨基酸, 是合成人体蛋白质的重要氨基酸之一, 也是胶原的重要组成成份^[18]。因为细胞外基质的主要成分是胶原和弹力蛋白, 共同构成了血管壁的主要骨架, 动脉粥样硬化斑块周围有大量炎性细胞浸润及聚集, 巨噬细胞的激活可加重斑块的溶解和破裂^[19]。为此, 脯氨酸主要在亚血瘀证期上调。而在心血瘀阻证期由于急性心肌缺血导致心肌组织内胶原蛋白合成增加, 导致脯氨酸入血量下降, 所以在该期含量反而显著下调^[20]。

亮氨酸、异亮氨酸水平在血瘀证前期组、亚血瘀证降低虽然差异无显著性, 但与亚血瘀证形成呈负相关, 在心血瘀阻证显著上调。亮氨酸、异亮氨酸属人体必需氨基酸。机体主要依赖调节支链氨基酸分解代谢以维持其水平稳态^[21]。首先, 亮氨酸、异亮氨酸分解代谢产生支链 α 酮酸; 支链 α 酮酸在线粒体支链 α 酮酸脱氢酶复合物的催化下, 进入三羧酸循环^[22]。支链 α 酮酸脱氢酶复合物对亮氨酸、异亮氨酸代谢扮演着及其重要的角色。有研究发现高脂喂养的大鼠肝的支链 α 酮酸脱氢酶复合物激活酶衰减, 肝的支链 α 酮酸脱氢酶复合物被激活, 促进支链氨基酸分解代谢导致亮氨

酸、异亮氨酸水平的下调^[23]。心血瘀阻证时的变化可能与亮氨酸、异亮氨酸是骨骼肌与心肌中唯一可调节蛋白质周转的氨基酸,并且能够更快的分解转化为葡萄糖,对血糖具有调节作用,可以修复肌肉、有效防止肌肉损伤,促进生长激素的分泌,帮助燃烧内脏脂肪有关^[24]。

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,血脂增高导致脂肪酸- β -氧化增强,生成大量的乙酰辅酶 A,而这将增加乳酸的含量,而随着时间的延长激活糖异生途径对代谢失衡的代偿,乳酸含量可能在血瘀证前期的基础之上下调,这与文献研究完全吻合^[25]。本课题组已研究表明,心血瘀阻证时乳酸含量增高,而此次研究显示下降,是否代表正常大鼠直接结扎冠状动脉与动脉粥样硬化大鼠结扎冠状动脉有着不同的糖酵解速率,具体的机制还有待进一步研究^[17]。

甘露糖能与巨噬细胞表面受体结合^[26],具有抑制炎症反应的作用,在血瘀证前期显著下降是因为注射维生素 D 导致内膜损伤,以拮抗在高脂介导下的爆发性炎症反应。其后随炎症反应贯穿整个血瘀证形成的过程,但随着整个抑炎系统的激活,使得甘露糖的水平回调^[27,28]。

既往研究多是从心血瘀阻证已形成的截点出发,心血瘀阻证的主要病机特点是瘀血内停,瘀血形成只是结局。结合已有的研究瘀血形成是多体现出急性缺血后能量代谢障碍。但定位在心的瘀血是如何形成的?结合胸痹“阳微阴弦”的病机观点,应当阳气亏虚在先。阳气运化水湿,阳气不足则水湿内停,凝聚成痰,痰浊入脉;痰浊黏滞于血脉之内,留而不去,凝结成块,久病入络,血府枯涩,脂浊胶结于固涸之脉管,形成坚块,脉络滞塞;血运不畅,瘀血内停,心失所养,发为心血瘀阻证。因此高脂饲料喂养大鼠,形成痰浊内聚,符合心血瘀阻证的病因,随着动脉粥样硬化的形成则体现出痰结血府的病理特点,通过冠状动脉结扎法形成心血瘀阻证。心血瘀阻证形成过程可以分为 3 个阶段。第 1 阶段,血瘀证前期:高脂饲料喂养大鼠模拟痰浊入血,血脂增高。第 2 阶段,亚血瘀证期:斑块形成,滞塞脉络。第 3 阶段,心血瘀阻证期:结扎大鼠冠状动脉左前降支导致心肌缺血。

为此本课题组设想心血瘀阻证动态演变的特点是:(1)痰浊内聚,注入血脉,血瘀证前期:高脂饮食引起体内脂质代谢紊乱,机体启动抗炎;(2)痰结血府,脉络滞塞,亚血瘀证期:持续高脂饮食所导致的尿素循环紊乱、肠道菌群失调、血管形态改变、肝脏功能障碍;

(3)血行不畅,心失所养,心血瘀阻期:急性心肌缺血后引起的糖代谢障碍。

总之,本项目通过对心血瘀阻证形成过程代谢产物组变化进行了初步研究,发现演变过程中小分子物质存在着非常明显的不同,代谢组学技术可以准确的区分每一个病理阶段。这种代谢物变化提供了复合干预模式下,心血瘀阻证发生发展过程中的生化信息,而这些生化信息可为心血瘀阻证的诊断以及干预提供有益的帮助。

参 考 文 献

- [1] 郭蕾,乔之龙. 候概念的状态内涵[J]. 诠释中华中医药杂志, 2015(4): 1086-1088.
- [2] 简维雄,左和宁,袁肇凯,等. 心血瘀阻证动态演变过程的实验研究[EB/OL]. 中国科技论文在线, 2014:11.
- [3] 谢海波,罗尧岳,莫新民,等. 活血、破血药对动脉粥样硬化大鼠 Bcl-2、Bax 蛋白表达及细胞凋亡率的影响[J]. 新中医, 2013, 45(4): 148-150.
- [4] 黄晓晨,宿树兰,郭建明. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考[J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.
- [5] 刘卫红,颜贤忠,张蕾. 代谢组学技术在高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀演变研究中的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(5): 684-686.
- [6] Yan B, Deng Y, Hou J, et al. UHPLC-LTQ-Orbitrap MS combined with spike-in method for plasma metabonomics analysis of acute myocardial ischemia rats and pretreatment effect of Danqi Tongmai Tablet [J]. Molecr BioSystems, 2015, 11(2): 486-496.
- [7] Ouimet M. Autophagy in obesity and atherosclerosis: Interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(6): 1124-1133.
- [8] Lepšanova LJ, Verešbaranjib I, Djerića M, et al. Content of stearic fatty acid (SFA) in adipose tissue and a process of atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2000, 151(1): 147-149.
- [9] 彭章平,乐建华主编. 现代缺血性心脏病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:69-70.
- [10] 李春. 心肌缺血心功能不全证候生物学基础与益心解毒方药理药效机制的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [11] 闫明先,赵华清,王文奇,等. 高脂血症大鼠胰腺腺泡细胞缩胆囊素/三磷酸肌醇信号通路的变化及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(23): 42-43.

- [12] MS Wilson, TM Livermore. A Saiardilinositol pyrophosphates: between signaling and metabolism [J]. *Biochem J*, 2013, 452(3): 369–379.
- [13] Nobuko H, Dileep SS. Carnitine and choline supplementation with exercise alter carnitine profiles, biochemical markers of fat metabolism and serum leptin concentration in healthy women[J]. *J Nutr*, 2003, 133(1): 84–89.
- [14] Wang L, Pumbo E, Davey M G, et al. Gene therapy for urea cycle disorders: characterization and rescue of the ornithine transcarbamylase knock-out mouse [J]. *Molec Genet Metabolism*, 2014, 111(3): 260–261.
- [15] 乔艺. 高脂诱导的氧化应激对小鼠肠道菌群改变与炎症反应的影响[D]. 无锡:江南大学, 2014.
- [16] 田洪源, 刘明启, 戴贤君. 蛋清、重组溶菌酶酶学性质及其对小鼠肠道菌群和血清生化指标的影响[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(10): 16–23.
- [17] 简维雄, 黄献平, 袁肇凯, 等. 基于气相色谱–质谱的心血瘀阻证血浆代谢组学研究[J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(4): 796–798.
- [18] Sakamoto H, Watanabe K, Koto A, et al. A bienzyme electrochemical biosensor for the detection of collagen I -hydroxyproline[J]. *Sensing Bio-Sensing Res*, 2015, 4(78): 37–39.
- [19] 庄世虹, 成蓓. 粥样硬化动脉壁胶原含量和组织蛋白酶 B 的表达[J]. *微循环学杂志*, 2013, 23(1): 36–38.
- [20] 赵娜, 于海奕, 于海涛, 等. miRNA-711-SP1–胶原 I 型信号通路参与吡格列酮抗心肌梗死后心脏纤维化作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(6): 464–472.
- [21] Huang Y, Zhou M, Het S, et al. Branched-chain amino acid metabolism in heart disease: an epiphenomenon or a real culprit [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(2): 220–223.
- [22] Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 391–396.
- [23] 廉坤. 高支链氨基酸血症加重心肌缺血再灌注损伤及其分解代谢研究[D]. 西安:第四军医大学, 2014.
- [24] Wynn RM, Li J, Brautigam CA, et al. Structural and biochemical characterization of human mitochondrial branched-chain α -ketoacid dehydrogenase phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(12): 9178–9192.
- [25] 刘卫红, 张琪, 颜贤忠. 高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀演变的代谢组学研究[J]. *中医杂志*, 2008, 49(8): 738–741.
- [26] Esparza M, Palomares B, García T, et al. PstS-1, the 38-kDa mycobacterium tuberculosis glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis[J]. *Scand J Immunol*, 2015, 81(1): 46–55.
- [27] Jokela TA, Kuokkanen J, Kärnä R, et al. Mannose reduces hyaluronan and leukocytes in wound granulation tissue and inhibits migration and hyaluronan-dependent monocyte binding [J]. *Wound Repair Regen*, 2013, 21(2): 247–255.
- [28] 李哲丽. 甘露糖对重症急性胰腺炎大鼠肠粘膜免疫屏障的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2013.

(收稿:2015–05–03 修回:2016–09–18)