



慢性心力衰竭大鼠肝脏组织的代谢轮廓

巫菲¹, 李彤^{2,3}, 张磊², 董志欢¹, 米睿²

(1. 天津医科大学三中心临床学院 300170; 2. 天津市第三中心医院; 3. 天津市人工细胞重点实验室)

【摘要】目的 建立慢性心力衰竭大鼠肝脏组织代谢轮廓模型,从代谢角度探索慢性心衰肝脏代谢变化规律,探寻对心力衰竭分子机制及疾病诊疗具有价值的特征代谢物。**方法** Wistar 雄性大鼠 20 只,心衰组行腹主动脉缩窄手术,对照组行假手术,术后饲养 24 周。利用代谢组学研究平台对大鼠肝脏组织进行代谢轮廓分析,建立心衰大鼠肝脏组织正交偏最小二乘判别模型及主成分分析模型,结合 SPSS 19.0 软件的数据处理最终得到特征代谢物。**结果** 成功建立了主成分分析模型及正交偏最小二乘判别模型,同时从模型中筛选并鉴定了 10 种在心衰组与对照组具有差异的特征代谢物,包括溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、油酸、甘氨酸、硫酸脱氢表雄酮等物质。**结论** 构建的代谢轮廓模型很好地拟合慢性心衰大鼠肝脏的代谢紊乱状态,筛选出的特征代谢物可为该疾病的病理生理分子机制以及该疾病诊疗等提供参考和帮助。

【关键词】 心力衰竭;色谱法;高压液相;质谱分析法;代谢组学;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0019-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.005

Metabolic profiling of liver in the rats with chronic heart failure

WU Fei¹, LI Tong^{2,3}, ZHANG Lei², DONG Zhi-huan¹, MI Rui²

(1. The Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Tianjin Third Central Hospital; 3. Tianjin Institute of Hepatobiliary Diseases, Tianjin Key laboratory of Artificial Cells)

【Abstract】Objective To establish a rat model of liver metabolism profile in chronic heart failure (CHF), to explore the dynamics of liver metabolism in CHF from the point of view of metabolism, and to find the characteristic metabolites valuable for the molecular mechanism and management of CHF. **Methods** Twenty male Wistar rats were assigned to the CHF group to receive aortic coarctation or to the control group to receive sham surgery, and were bred for 24 weeks following surgery. The metabolic profiling of the rat liver tissues was analyzed on a metabolomics research platform. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model and principal component analysis (PCA) model were established for liver tissues of the CHF rats, and the characteristic metabolites were finally derived by data processing with SPSS 19.0 software. **Results** The PAC and OPLS-DA models were established successfully. Ten characteristic metabolites with significant differences between the CHF and control groups, including lysophosphatidyl choline, lysophosphatidyl ethanolamine, oleic acid, glycocholic acid, and dehydroepiandrosterone sulfate, were screened and identified from the models. **Conclusions** The metabolic disorders in CHF rats are well fitted to the established metabolic profile models, and these identified characteristic metabolites may provide reference for the pathophysiological molecular mechanism and management, etc., of chronic heart failure.

【Key words】 Chronic heart failure; Chromatography, high pressure liquid; Mass spectrometry; Metabolomics; Rat

[基金项目]天津市卫生局攻关项目(12KJ106)。

[作者简介]巫菲(1989-),女,硕士研究生,主要从事心血管代谢研究。

[通讯作者]李彤,博士生导师,主要从事心血管研究。E-mail:Litongtj@163.com。

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是高血压和冠心病等多种心血管疾病进行性发展的终末阶段。肝脏是机体代谢的枢纽,参与了合成、分解、转化和排泄等代谢过程,心力衰竭可以导致不可逆的肝脏损伤和肝硬化,反之,肝损伤会加剧心衰患者预后不良,给患者及社会造成较大的负担。因此了解心力衰竭状态下肝组织代谢变化有重要意义。代谢组学是一种研究生物体状态改变后内源性小分子物质变化情况的新技术,可揭示生物体在内外因素的刺激后整个代谢网络的变化规律,得出和病理状态、疾病进程相关的系统生物学结果^[1]。本研究利用代谢组学的研究平台构建疾病区分模型,筛选慢性心力衰竭状态下肝组织特征代谢产物,初步探讨心衰状态下肝组织代谢变化,为该疾病病理生理分子学机制以及该疾病诊疗等提供参考和帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

正常雄性 Wistar 大鼠 20 只,SPF 级,体质量 225 ~ 250 g,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】。Accela 超高效液相色谱仪、低温高速离心机 Multifuge X1R 型、LTQ Orbitrap XL 质谱仪(美国 Thermo 公司);Vevo2100 view 高分辨率小动物超声系统(英国 Sonic 公司);甲酸、乙腈、甲醇购自德国 Merck KGaA 公司。实验相关操作在天津医科大学动物实验设施内进行【SYXK(津)2009-0001】。

1.2 方法

1.2.1 分组:将大鼠按随机数字表法分为心力衰竭组(CHF 组)、对照组(SHAM 组)。

1.2.2 模型制备:3%戊巴比妥钠(0.05 g/kg)溶液行腹腔注射麻醉。手术区域备皮、消毒,腹正中暴露腹腔探查,游离腹主动脉,穿过 3-0 丝线,进行缺血预适应,将腹主动脉缩窄于平头绿色注射器针头(21G, d=0.6 mm)上,后撤出针头并确认缩窄效果良好,逐层关闭腹腔。消毒、排气并注射 20 万单位青霉素预防腹腔感染。术后合理饲养 24 周,行心动超声检测。Sham 组:经相同手术操作程序,腹主动脉穿线缺血预适应后不结扎,饲养同 CHF 组。

1.2.3 标本的采集和预处理:大鼠脱颈处死后,摘

取肝脏组织,迅速液氮冷冻后置于 -80℃ 超低温冰箱保存。取出组织称重,以 1:3 加入纯水充分研磨,超声震荡器混匀,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 100 μL,再加入 300 μL 甲醇,充分震荡摇匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μL 真空离心蒸干得干粉后加 300 μL 乙腈重新溶解,上样。

1.2.4 样本分析:液相色谱为 Thermo 公司的 Accela 超高效液相色谱系统。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD 反相 C18 柱(2.1 mm i. d. x 50 mm. 1.9 μm)。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,色谱洗脱过程为 15 min,进样量为 10 μL,流速设定在 200 μL/min。洗脱梯度起始为 5% B 并维持 3 min,然后 10 min 内 B 线性增加至 50%,再往后 3 min 内 B 增加至 95%,并维持 4 min,然后降回 5%,平衡色谱柱 4 min,进样量为 10 μL。自动进样器内温度保持在 4℃。质谱采用正离子模式进行检测,采用棒状(centroid)模式扫描,扫描质荷比区间为 50 ~ 1000 (m/z)。二级质谱采用选择离子检测(SIM)模式,碰撞能量为 35(标准化碰撞能量)。分辨率为 100000 (FMHW)。毛细管电压 30 V,锥孔电压 150 V,离子源电压 4.5 kV,鞘气流速为 30 arb,辅气流速 5 arb。使用厂家提供校正液进行质量校正。

1.2.5 数据处理:根据筛选出的变量重新设定仪器参数,对质控溶液进行 MS/MS 扫描,获得这些代谢物的二级质谱图;利用精确质量数(m/z)和 MS/MS 图谱搜索 Mass Frontier 6.0 自带数据,Medlin 数据库,KEGG 数据库以及 HMDB 数据库,经过结构推导得出初步结果;通过与标准品的 MS/MS 质谱图对比得到鉴定。

1.2.6 统计学方法:经 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行两个独立样本的非参数检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏超声结果

CHF 组可见射血分数(EF)、缩短分数(FS)、收缩期末左室后壁厚度(LVPW)、收缩期室间隔厚度(IVS)、主动脉平均流速(Mean Vel),主动脉峰值流速(Peak Vel)明显降低(表 1)

表 1 各组超声心动检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Cardiac echocardiography of the rats

项目 Indexes	CHF 组 CHF group	SHAM 组 Sham group	P 值
左心室射血分数/(%) EF	43.2 ± 3.0	61.2 ± 2.5	0.018
左心室短轴缩短分数/(%) FS	22.2 ± 1.8	33.9 ± 1.8	0.013
室间隔收缩期厚度/(mm) IVS;s, mm	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.8	0.020
左心室后壁收缩期厚度/(mm) LVPW;s, mm	1.5 ± 0.1	1.98 ± 0.2	0.013
主动脉平均流速/(mm/s) Mean Vel, mm/s	388.1 ± 29.7	675.7 ± 98.3	0.010
主动脉平均压差/(mmHg) Mean Grad, mmHg	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.5	0.012
主动脉峰流速/(mm/s) Peak Vel, mm/s	695.1 ± 45.9	1218.3 ± 18	0.008
主动脉峰压差/(mmHg) Peak Grad mmHg	2.0 ± 0.3	6.06 ± 1.7	0.010

2.2 病理学检查

同倍数下观察 CHF 组可见肝组织的病理严重程度与心衰模型构建的时间呈正相关,镜下主要表现为肝脏淤血性损害。可见肝血窦增宽,细胞出现轻度肿胀,细胞核出现深染、核固缩改变,提示可能发生了肝细胞凋亡;肝脏病理改变加重,静脉系统内淤血明显,肝细胞出现大面积坏死,尤其以中央静脉周围多见,局部仍还有散在的形态正常的细胞团。肝细胞本身出现核固缩、核碎裂、核溶解改变,并存在不同程度的脂肪变,没有出现明显的肝硬化征象,无明显的结缔组织增生和假小叶形成。(图 1)

2.3 数据的总离子流图和质控分析

以正常和心衰肝脏样本为依托,结合超高效液相色谱与质谱连用系统平台成功得到标本的总离子流图(图 2)。通过质控溶液在整个样品分析过程中的检测分析评价 UPLC-MS 系统的工作稳定性,对 15 个质控溶液数据进行主成分分析(PCA)后,得到一个拥有 2 个成分的 PCA 模型,系统在样品分析过

程中相对平稳,整个质控没有出现界外值。且根据相关文献提出的有关 UPLC-MS 平台重复性的质控合格标准本研究 15 个质控液穿插于样品分析过程中,可靠离子峰分布在 85.6% 到 94.8% 之间。因此,可以认为该批次样本分析结果可靠。

2.4 代谢轮廓对疾病的区分能力

Simca 分析软件将数据转换成 UV 格式和平均中心化模式,获得更直观的图像结果。Simca 软件进行 PCA 分析共获得四个主成分, $R^2X = 42.1%$, $Q^2 = 22.4%$ 。当 R^2X 值大于 40% 就可以认为该模型可靠,因此当前 PCA 模型可用于显示两组之间的代谢差异(图 3A)。同时构建正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型分析,该模型有一个预测主成分,三个正交主成分, $R^2X = 68.5%$, $R^2Y = 99.3%$, $Q^2 = 96.1%$,由此可见此模型具有很好的拟合度和预测能力。模型组样本数据构建的 OPLS-DA 模型在第一预测主成份与第一正交主成份上的打分图(图 3B)。全部的验证组标本均能够正确的归入相应分组聚类,模型的预测准确度达 100%。

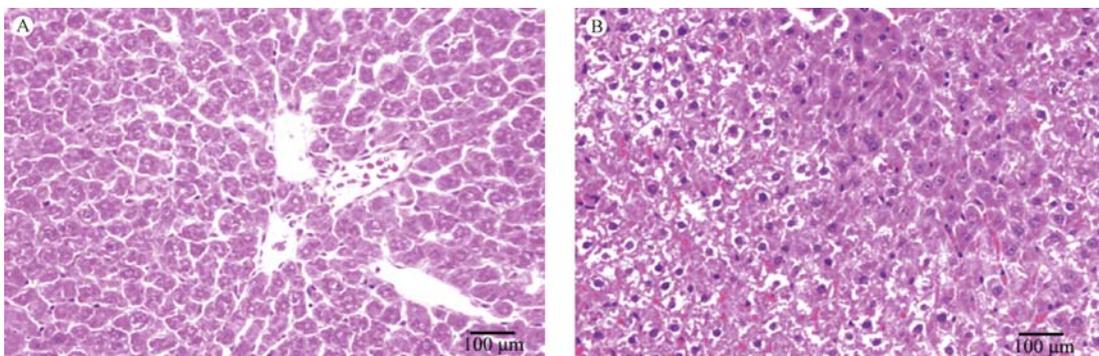


图 1 光镜下肝脏病理改变。A: 正常肝脏; B: 心衰肝脏(标尺 = 100 μm)

Fig.1 Pathological changes of the liver tissues. A: Liver of the sham group; B: Liver of the CHF group.

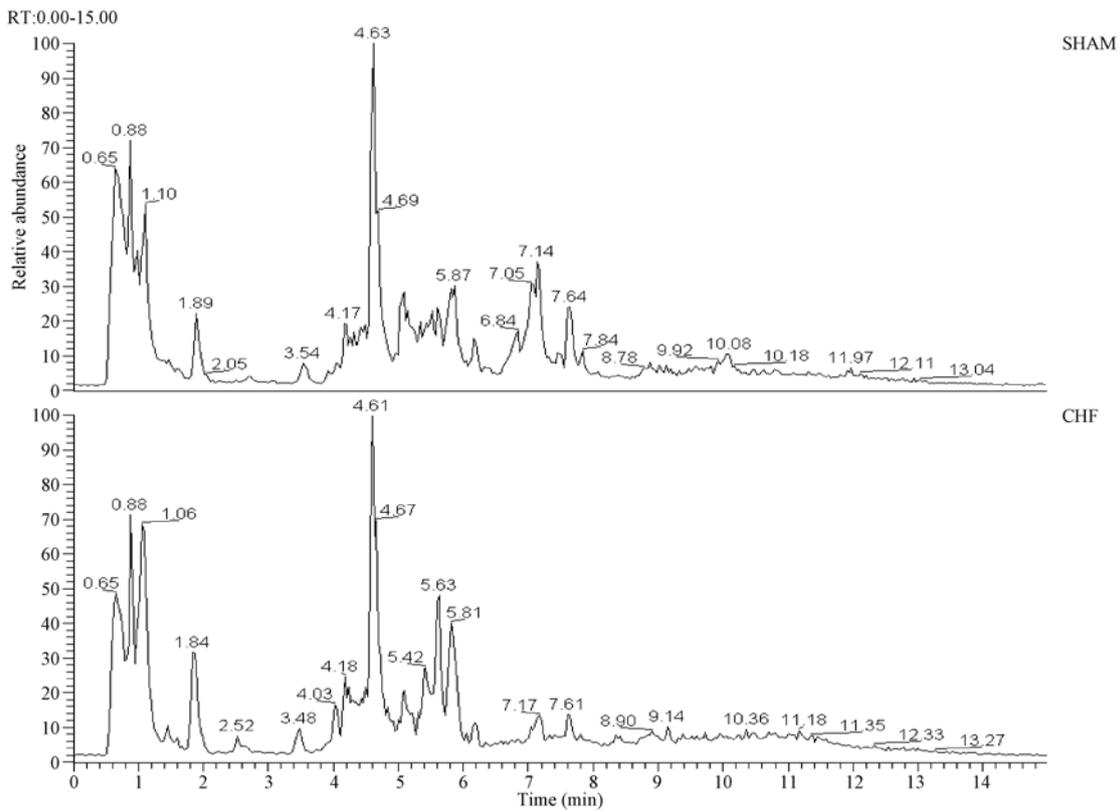
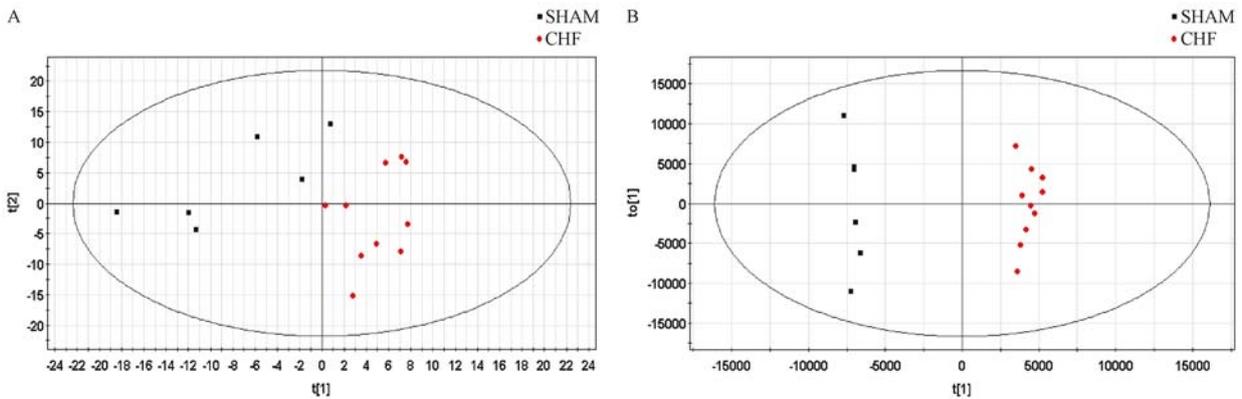


图 2 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of serum metabolic profile



A: PCA 模型; B: OPLS-DA 模型; CHF: 心衰组; SHAM: 对照组

图 3 肝脏样本代谢轮廓模型

A: PCA model. B: OPLS-DA model. CHF: Heart failure group. SHAM: Control group.

Fig. 3 Metabolic profile of the liver samples

2.5 特征代谢物的筛选和鉴定

根据检测得出的一级质谱, 设定质谱仪分辨率为 100000 (FMHW), 得到特征代谢物的精确质荷比数值, 然后进入 HMDB 数据库比对查找, 按照质荷比(m/z)值误差不超过 0.01 的标准, 得到与之相匹配的物质鉴定结果; 将特征代谢物进行二次质谱 (MS/MS) 检测, 得到该代谢物的二级质谱图, 同

HMDB 数据库内的理论碎片进行比对, 按照特征代谢物的二级质谱质荷比值与理论碎片比对差值 ≤ 0.01 , 且理论碎片与特征代谢物的二级碎片的主要峰匹配, 能够覆盖特征代谢物二级碎片主要质谱峰的 80% 以上, 即可认定该特征代谢物为理论碎片物质, 有鉴定结果的特征代谢物共计 10 个, 且在 2 组间差异均有统计学意义 (表 2)

表 2 特征代谢物鉴定结果

Tab. 2 Identification of the characteristic metabolites

No	保留时间 min	质荷比 m/z	电离方式 Ionization methods	代谢物鉴定结果 Results of metabolite identification	心衰组 VS 对照组 CHF vs. SHAM
1	8.7	504.3	M + Na	LysoPE(18:0/0;0)	DOWN **
2	7.0	500.2	M + Na	LysoPE(0;0/18;2(9Z,12Z))	DOWN **
3	7.0	502.3	M + H	LysoPE(0;0/20;4(5Z,8Z,11Z,14Z))	DOWN **
4	7.1	520.3	M + H	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	DOWN * *
5	5.6	504.2	M + Na	LysoPC(15:0)	UP **
6	5.4	410.2	M + NH ₄	LPA(16:0/0;0)	UP **
7	6.2	300.2	M + NH ₄	油酸	DOWN **
8	5.6	466.3	M + H	甘氨酸	UP **
9	0.7	230.0	M + H	麦角硫因	UP **
10	4.6	386.2	M + NH ₄	硫酸脱氢表雄酮	DOWN **

LysoPC: 溶血磷脂酰胆碱(LPC); LysoPE: 溶血磷脂酰乙醇胺(LPE); $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

在心血管疾病的研究中代谢组学已得到广泛的应用,有关心力衰竭的代谢研究多集中于血清、血浆、尿液等物质,对于组织代谢变化的关注较少。

心力衰竭过程中,肝脏由于长期的体循环淤血会发生了病理学改变。越来越多的研究显示心力衰竭过程中会出现血清白蛋白下降、转氨酶升高、黄疸等表现,表明肝脏在心衰过程中存在代谢紊乱,肝功能的进行性损害会制约且影响着心衰患者的诊疗效果及预后。故本文应用代谢组学方法研究了慢性心力衰竭大鼠模型肝脏组织的代谢变化,构建慢性心力衰竭大鼠的代谢轮廓,成功筛选出肝脏特征代谢物,对特征代谢物分析发现其主要与糖脂代谢、细胞膜代谢等有关。

本研究结果显示 3 种溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱(18:2(9Z, 12Z)) 对照组比较呈明显降低趋势,而溶血磷脂酰胆碱(15:0)与对照组则出现了明显上调的趋势,该类物质主要是与细胞膜的水解代谢有关。溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)通过磷脂酶 A2 水解磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺生成。研究表明在肝组织中磷脂代谢的变化与肝组织修复过程中肝细胞膜和细胞内各种生物膜的更新换代相关。此外磷脂是胆汁和膜表面活性物质的成分之一,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导。研究还表明当溶血磷脂类物质释放入循环系统会给机体带来巨大的危害。LPC 参与心血管内皮的损伤以及炎症反应,在体内大量的 LPC 会引起心肌细胞膜的电信号紊乱,引发心律失常^[2]。LPE 会影响钙离子通道信号传导,从而影响心肌的收缩功能^[3]。本研究中肝组织中溶血磷脂类代谢异常应与心衰状态下,心排量减少,肝

脏低灌注造肝脏损伤,肝细胞出现大面积坏死,肝细胞凋亡,线粒体、细胞器数目的减少相关。

此外,本研究显示心衰状态下肝组织中油酸,硫酸脱氢表雄酮相对于对照组呈显著增高趋势,甘氨酸,麦角硫因相对于对照组呈降低趋势。这些变化主要反映心衰大鼠肝脏中糖脂类、胆汁酸,类固醇类等代谢紊乱。油酸(oleic acid, OLA)一种含有一个双键单不饱和游离脂肪酸。近年来研究指出心力衰竭本身是一种代谢综合征,而心力衰竭的患者往往存在胰岛素抵抗^[4], Perdomo 等研究表明油酸可预防心血管胰岛素抵抗、改善内皮功能障碍,降低促炎反应信号扩散和减少细胞凋亡,有助于改善动脉粥样硬化过程和斑块稳定性^[5]。在饮食中用油酸代替亚油酸可以改善 2 型糖尿病患者中低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)的水平。本研究中油酸含量显著降低,这是否与机体胰岛素敏感性下降相关有待进一步研究。而对于心衰患者适量增加富含油酸的饮食可有助于改善其临床转归。

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)是循环血液中浓度最高的类固醇激素,在体内以硫酸盐形式(DHEAS)的形式存在。DHEAS 在经肝脏、脂肪、肌肉等组织可转化性激素、皮质醇和皮质酮等其他激素,经过血液循环到达靶器官,发挥调解机体生理功能的作用。在动物实验证实 DHEAS 能降低血浆 TG 和磷脂^[6]。Kathleen Brennan 等人研究表明 DHEAS 与胰岛素抵抗指数 HOMA-IR 负相关,提示 DHEAS 有利于增加胰岛素敏感性,具有提高胰岛素水平、抗糖尿病作用^[7]。老年人口服 DHEA(85 mg/d)可有效地减少血浆脂质过氧化物,抑制低密度脂蛋白的氧化^[8]。本研究中肝脏组织中的脱氢表雄酮呈明显下调趋势,这与以往研究中

血清中 DHEAS 下调是相一致的,提示在心衰状态下肝脏的物质转化作用出现了异常,并可能通过受体机制和离子通道影响肝脏糖脂质代谢。对与心衰患者是否可以补充 DHEA 治疗,其损害作用及相应的机理可作为进一步的研究方向。

甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)是由胆酸与甘氨酸在肝内合成的结合型胆汁酸,是胆汁酸的主要成分之一。在正常生理情况下外周血清 GCA 浓度维持较低的稳定水平,当肝脏发生病变时,血清 GCA 会出现不同程度的增高。既往的研究表明当血清中出现较高浓度的胆汁酸可能提示心脏疾病。2013 年, Moezi 等报道表明胆汁酸是导致心血管功能异常的主要因素。在体外实验中,亲脂性胆汁酸可对离体心肌细胞造成损伤,破坏心肌细胞线粒体功能诱导心肌细胞凋亡^[9]。细胞水平研究发现牛磺去氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)、牛磺胆酸(taurocholate, TC)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid, GCA)均可影响心肌细胞的收缩。甘氨酸胆酸在 300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时候会形成特殊的钙波频率双相改变和细胞内钙超载,从而改变钙离子动力学,对心肌细胞收缩起抑制作用^[10]。本研究中发现在心力衰竭时的肝脏组织中甘氨酸胆酸呈上调趋势,这应与早期肝损害相关,心衰进展时肝瘀血加重造成肝实质损害,肝脏对甘氨酸胆酸摄取和排泄功能发生障碍从而导致血清甘氨酸胆酸量增高。循环中胆汁酸升高可能会影响心肌细胞功能,在心衰的发生和进展中起一定作用,对此类产物进行监测可以为心力衰竭的临床诊治提供帮助。

综上所述,对心衰大鼠肝脏代谢轮廓的研究并对特征代谢物代谢途径进行分析,可为心力衰竭的病理生理分子机制以及该疾病诊疗等提供新的思路。

参考文献:

- [1] 马晓丽, 骆新, 卢伟, 等. 基于 ^1H 核磁共振谱分析的自发性高血压大鼠尿液代谢特征[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 20-23.
- [2] 郑明奇, 刘刚, 田立. 溶血磷脂酰胆碱对 T 型钙离子通道的心肌细胞内信号调控机制[J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2013, 1(1): 24-26.
- [3] Park KS, Lee HY, Lee SY, et al. Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: Involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor [J]. FEBS Lett, 2007, 581(23): 4411-4416.
- [4] Perrone-Filardi P, Paolillo S, Costanzo P, et al. The role of metabolic syndrome in heart failure [J]. Eur Heart J. 2015, 36(39): 2630-2634.
- [5] Perdomo L, Beneit N, Otero YF, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process [J]. Cardiovasc Diabetol. 2015, 14: 75. doi: 10.1186/s12933-015-0237-9.
- [6] Lea-currie YR, Wu SM, McIntosh MK. Effects of acute administration of dehydroepiandrosterone sulfate on adipose tissue mass and cellularity in male rats [J]. Int J Obesity. 1997, 21: 147-154.
- [7] Brennan K, Huang A, Azziz R. Dehydroepiandrosterone sulfate and insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2009, 91(5): 1848-1852.
- [8] Longcope C. Metabolism of dehydroepiandrosterone [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995, 774: 143-147.
- [9] Zavec JH, Battarbee HD. The role of lipophilic bile acids in the development of cirrhotic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Toxicol, 2010, 10(2): 117-129.
- [10] Gorelik J, Harding SE, Shevchuk AI, et al. Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics [J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103(2): 191-200.

[修回日期]2016-05-12