

·血瘀证治·

基于冠心病血瘀证心肌细胞能量代谢 网络模型的流平衡分析

袁肇凯^{1,2}, 简维雄^{1,2}, 黄献平^{1,3}, 张月娟¹, 孙安会¹, 夏世靖¹

(1. 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科, 湖南 长沙 410007; 2. 国家中医药管理局局级重点实验室, 湖南 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨冠心病(coronary artery heart disease, CHD)急、慢性血瘀证心肌细胞能量代谢的变化特点。**方法** (1) 运用 FluxExplorer 软件平台构建起的 CHD 血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型; (2) 应用 GC-MS 技术和血气自动分析仪从健康对照、CHD 慢性血瘀证、CHD 急性血瘀证三组大鼠模型中取冠状动脉血检测葡萄糖、脂肪酸及血氧含量; (3) 检测结果代入网络模型, 通过流平衡分析 CHD 急、慢性血瘀证状态下参数的特点。**结果** (1) 三组的糖酵解、脂代谢和三羧酸循环均已被激活, 但网络运算后各组代谢物的数值则有明显差别, 均呈现出健康对照组>CHD 慢性血瘀证组>CHD 急性血瘀证组的趋势。(2) 三组心肌细胞能量代谢的血糖、脂肪酸和血氧含量及 ATP 的产量均呈递减的趋势, 这与三组中糖酵解的关键酶(HK、pfk、PK)、三羧酸循环的关键酶(Cs、Icdh、Od)的浓度呈一致性变化。**结论** CHD 急性血瘀和慢性血瘀不同证候的形成可能与机体内心肌细胞能量代谢的水平密切相关。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 能量代谢; 网络; 流平衡分析; 心肌细胞

[中图分类号] R241

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.006

The Flux Balance Analysis based on Network Model of Myocardial Cell Energy Metabolism of Blood Stasis Syndrome in Coronary Heart Disease

YUAN Zhaokai^{1,2}, JIAN Weixiong^{1,2}, HUANG Xianping^{1,3}, ZHANG Yuejuan¹, SUN Anhui¹, XIA Shijing¹

(1. Key Discipline of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine Administration, Changsha, Hunan 410208, China;

3. Hunan Key Labtory of Hunan University Of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the characteristics of myocardial cell energy metabolism changes of acute and chronic blood stasis syndrome of coronary heart disease (CHD). **Methods** (1) The CHD myocardial cell energy metabolism network model of blood stasis syndrome were built up by using FluxExplorer software platform. (2) The coronary arterial blood glucose, fatty acids and blood oxygen content, which were taken from from healthy control group, CHD with chronic blood stasis syndrome, CHD with acute blood stasis syndrome groups, were detemined by GC-MS technology and automatic blood gas analyzer. (3) The results were into network model, the characteristic parameters of acute and chronic CHD with blood stasis syndrome were analyzed by flux balance. **Results** (1) Three groups of glycolytic, lipid metabolism and the TCA cycle has been activated, but after the network operations metabolite values were significantly different in each group, which showed a healthy control group > CHD with chronic blood stasis syndrome > CHD with acute blood stasis group trend. (2) The glucose, fatty acids and blood oxygenation content and yield of ATP in three groups showed a decreasing trend. The key enzymes of glycolysis (HK, PFK, PK), key enzymes of the TCA cycle (Cs, Icdh, Od) showed consistent changes. **Conclusion** The form of different CHD with acute blood stasis and chronic blood stasis syndromes were closely related to

[收稿日期] 2015-10-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273670;81202647);教育部博士点基金项目(20124323130001)。

[作者简介] 袁肇凯,男,教授,博士研究生导师,研究方向:心病证候本质的研究。

levels of myocardial energy metabolism in the body.

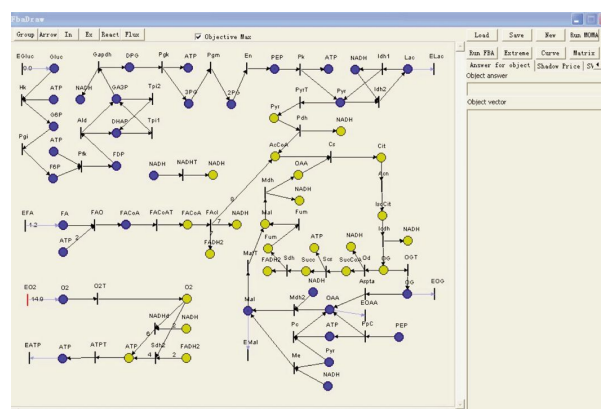
[Keywords] coronary heart disease; blood stasis syndrome; energy metabolism; networking; flux balance analysis; myocardial cell

近些年来,有学者认为,中医证候是一个涉及到多种物质的含量、结构、功能及其相互关系的复杂系统,难于用单一的生理学或生化学指标来表达^[1]。既往以还原论为基础的证候研究模式忽略了证候本身的复杂特性,仅考虑单因素的关联而忽视了诸指标之间的关联,淡化了生物体内指标之间的相互作用所涌现出的各种功能变化,故难于全面阐释证候发生发展的机理和过程^[2]。而以“计算”为先导的系统生物学(Systems Biology),强调“计算与实验”的交融,揭示病证系统内部组成部分的相互作用和生物学网络的运行规律,已成为当前中医证候本质研究的热点^[3]。本项目是在系统生物学指导下,基于 FluxExplorer 平台开展冠心病 (coronary artery heart disease, CHD) 心血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型的实验研究,本文报告了应用流平衡分析(flux balance analysis, FBA)对冠心病急、慢性心血瘀证状态下心肌细胞能量代谢变化特点的研究。

1 材料与方法

1.1 CHD 血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型的构建

流平衡分析(FBA)是基于化学计量矩阵的代谢网络的模拟方法,已被广泛应用于模拟若干物种的多种代谢网络^[4]。FluxExplorer 是 Luo RY 等^[5]研制的以 FBA 方法为主的一个通用的基于化学计量矩阵的代谢网络建模及分析平台,用户通过图形化操作可完成模型的构建。在该平台中除 FBA 之外,还整合了近些年来发展起来的代谢调整最小化分析(MOMA)、影子价格分析(SPA)、端途径分析(EPA)、奇异值分解(SVD)和曲线分析(CA)等方法。本项研究则是运用 FluxExplorer 软件平台构建起的心肌细胞能量代谢网络的初始网络模型,并运用气相色谱-质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)技术和血气自动分析仪从 CHD 急、慢性血瘀证实验模型中提取代谢产物谱及相关实验数据,调整初始网络模型的系统状态,从整体上构建起具有中医病理特点的 CHD 慢性心血瘀证和急性心血瘀证心肌细胞能量代谢的病证网络模型(见图 1)。



注:黄色的小圆代表线粒体内的代谢物,蓝色的小圆代表细胞质内的代谢物,短竖线代表反应,反应的方向由箭头表示,黑色的箭头代表系统内的反应流,蓝色的箭头代表系统内外交换的反应流。

图 1 基于 FluxExplorer 构建的冠心病慢性心血瘀证心肌细胞能量代谢的网络模型

1.2 病证模型的分组复制及样本提取

取健康 SD 雄性大鼠体质量(180±10) g 50 只,随机提取 10 只作为健康对照组,其余 40 只高脂饲料喂养 2 个月(配方:胆固醇 3%、胆酸钠 0.5%、丙基硫氧嘧啶 0.2%、猪油 10%、白糖 5%+基础饲料 81.3%),尾静脉取血检测血脂、血液流变学,取其中血脂增高、血液流变学异常(提示血瘀病性)的 30 只大鼠继续造模,随机平均分为 2 个病证造模组,每组 15 只大鼠。

1.2.1 CHD 慢性心血瘀证模型 (CHD 慢瘀证组) 参考王阶^[6]报道及预实验,将上述 15 只血瘀模型大鼠给予异丙肾肾上腺素腹腔注射[60 mg/(kg·d)],连续 7 d,并继续高脂饲料喂养,待停药 2 d 后检测大鼠心电图,以 II 导联心电图出现 ST 段或 J 点上抬或下移、T 波低平或倒置(提示心肌缺血)作为 CHD 慢性心血瘀证造模成功的标志。本模型的成模率为 65% 左右,故 CHD 慢瘀证组为 10 只。

1.2.2 CHD 急性心血瘀证模型 (CHD 急瘀证组) 参照袁肇凯主编《中医诊断实验方法学》“冠状动脉结扎法”造模^[7],将上述 15 只血瘀模型大鼠在腹腔麻醉下开胸,于大鼠肺动脉圆锥与左心耳交界稍下 1~2 mm 处用 6/0 号丝线穿过并结扎左冠状动脉前降支,以结扎部位以下心肌变苍白、搏动减弱、II 导联心电图出现 ST 段弓背向上明显抬高(提示心肌缺血)作为 CHD 急性心血瘀证造模成功的标志;然

后逐层缝合胸壁,普通饲料喂养 2 d。本模型的成模率为 66%左右,故 CHD 急症证组为 10 只。

健康对照组、CHD 慢瘀证组、CHD 急瘀证组大鼠均开胸后在心脏左前降冠状动脉处取冠状动脉血液进行检测。取血用注射器内事先用肝素冲洗,并确保注射器的针头和针管紧密结合,及时进行检测。

1.3 实验指标检测

由于 CHD 心血瘀阻证的形成与心肌的能量物质和血氧供给不足有密切关系,因此本文主要报告各组大鼠冠脉血液中葡萄糖(Gluc)、脂肪酸(FA)、及血氧(O₂)含量变化对网络模型的影响。

1.3.1 葡萄糖、脂肪酸检测 应用 GC-MS 法检测。

确定进样量、气相象条件、质谱条件、离子源温度、扫描范围等 GC-MS 的各项分析条件,分别移取三组大鼠冠脉血液的上清液到微量进样管,供 GC-MS 的检测分析。将获得总离子流色谱图利用 GC-MS 自带质谱数据库进行代谢产物鉴定。根据 GC-MS 总离子流图中各峰的保留时间挑选共有峰,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。

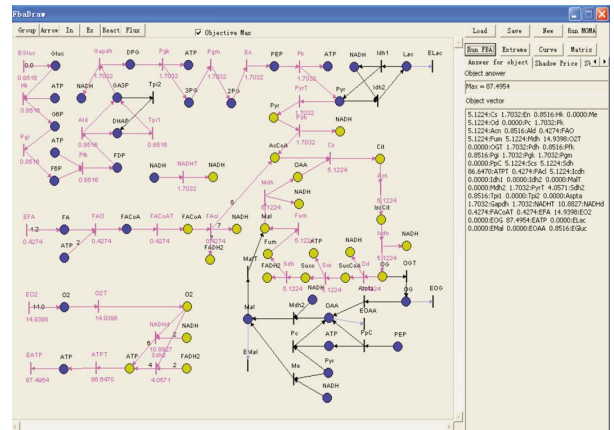
1.3.2 动脉血氧含量检测:应用 GEM-3000 型血气自动分析仪检测,严格按照仪器操作规程检测大鼠冠脉血氧含量。

1.4 网络模型的流平衡分析

基于 FluxExplorer 平台上构建的心肌细胞能量代谢网络模型包括了 34 个代谢物和 43 个代谢反应,涉及到糖酵解、脂肪酸代谢、三羧酸循环、氧化磷酸化途径、穿梭系统和碳回补途径,以及某些代谢物在线粒体与细胞质之间的转运。由于心肌的能量供给主要来源于线粒体产生的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP),故以 ATP 产生的最大化被设为该网络系统的目标函数^[9]。

1.4.1 实验检测值的输入 按照本网络模型输入的要求,将各组的葡萄糖、脂肪酸和血氧检测值转换成该项指标的输入值,并将每只大鼠的各项指标的输入值代入已建立的“心肌细胞能量代谢网络模型”中的相应位置。

1.4.2 网络模型的流平衡分析 点击“Run FBA”,网络模型“流平衡分析”运算之后则可在网络界面上直观地看到运算的结果(见图 2),图中所有被激活的代谢反应及其当前值均以粉红色标示,而未被激活者仍呈为黑色;在网络界面的右侧框内显示出 FBA 运算之后网络的 46 个代谢物的数值结果。三组中的每只大鼠均进行 FBA,并计算出每组各项代谢物质的均值。



注:所有被激活的代谢反应和其当前值均以粉红色表示,而未被激活的反应则仍然为黑色。图中右侧上框内为 FBA 分析结果

图 2 冠心病慢性血瘀证心肌细胞能量代谢的网络模型流平衡分析

2 结果

健康对照组、CHD 慢瘀证组和 CHD 急瘀证组三组的大鼠心肌细胞能量代谢网络模型运算结果均显示,糖酵解、脂代谢和三羧酸循环均已被激活(网络图中呈粉红色部分)。网络图框右侧所显示的运算后各组代谢物的数值则有明显差别,呈现出健康对照组>CHD 慢瘀证组>CHD 急瘀证组的趋势。由于心肌细胞能量代谢主要为酶促反应,因此本文重点对三组中参与糖酵解和三羧酸循环的关键酶及能源物质进行分析比较。

2.1 三组糖酵解中关键酶含量的比较

三组代谢网络中糖酵解过程中的 HK(己糖激酶)、pfk(磷酸果糖激酶)、PK(丙酮酸激酶)三个关键酶的含量如表 1 所示。三组中三个关键酶的含量比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),其中,CHD 急性血瘀证组的三个关键酶含量均明显低于慢性血瘀证组和健康对照组;CHD 慢性血瘀证组仅 HK 含量低于健康对照组,而 pfk 和 PK 含量虽低于健康对照组,但尚无统计学差异。

2.2 三组三羧酸循环中关键酶含量的比较

三羧酸循环过程中关键酶主要有 Cs(柠檬酸合酶)、Icdh(异柠檬酸脱氢酶)和 Od(α -酮戊二酸脱氢酶复合体),如表 2 所示,三个组中三个关键酶的含量比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),其中,这三个关键酶含量均呈现健康对照组>CHD 慢性血瘀证组>CHD 急性血瘀证组的趋势(均 $P < 0.01$)。

2.3 三组能量物质含量的比较

由表 3 可见,通过网络运算后,三组之中,健康对照组冠状动脉血液中的血糖、脂肪酸和血氧含量最高,因而其提供心肌能量的 ATP 产量也最高,达

(133.098 7±13.702 6)单位;CHD 慢性血瘀证冠脉血中能量物质的含量居其次,ATP 的产量居中,(87.516 5±4.841 9)单位,占健康组的 65.75%;CHD 急性血瘀证冠脉血中能量物质的含量和 ATP 的产

量最低,(60.800 6±5.410 7)单位,仅占健康组的 45.68%,与健康对照检查和 CHD 慢性血瘀证组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 三组网络模型中糖酵解关键酶含量的比较

($\bar{x}\pm s$,单位)

组别	<i>n</i>	HK	pfk	PK
健康对照组	10	1.000 1±0.165 2	1.003 2±0.154 1	2.000 3±0.330 4
CHD 慢瘀证组	10	0.851 6±0.150 2*	0.870 8±0.150 3	1.703 3±0.380 5
CHD 急瘀证组	10	0.541 9±0.198 6***▲▲	0.525 6±0.187 5***▲▲	1.083 9±0.397 2***▲▲
<i>F</i> 值		14.508	11.489	10.233
<i>P</i> 值		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

注:与健康组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与慢瘀组比较 ▲▲ $P<0.01$ 。

表 2 三组网络模型中三羧酸循环关键酶含量的比较

($\bar{x}\pm s$,单位)

组别	<i>n</i>	Cs	Icdh	Od
健康对照组	10	7.897 6±0.807 0	7.907 7±0.791 7	7.769 2±0.817 7
CHD 慢瘀证组	10	5.123 7±0.317 6**	5.246 9±0.338 8**	5.044 7±0.297 4**
CHD 急瘀证组	10	3.577 3±0.305 0***▲▲	3.638 2±0.343 2***▲▲	3.499 6±0.279 9***▲▲
<i>F</i> 值		9.511	9.372	10.003
<i>P</i> 值		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

注:与健康组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与慢瘀组比较 ▲▲ $P<0.01$ 。

表 3 三组网络模型中能量代谢物质含量的比较

($\bar{x}\pm s$,单位)

组别	<i>n</i>	Gluc	FA	O ₂	ATP
健康对照组	10	1.002 7±0.151 8	0.737 2±0.077 3	22.955 5±2.349 5	133.098 7±13.702 6
CHD 慢瘀证组	10	0.837 8±0.161 8*	0.427 6±0.105 0**	14.939 8±0.891 4**	87.516 5±4.841 9**
CHD 急瘀证组	10	0.533 3±0.178 6***▲▲	0.311 7±0.051 4***▲▲	10.420 3±0.894 8***▲▲	60.800 6±5.410 7***▲▲
<i>F</i> 值		10.436	12.764	15.312	16.213
<i>P</i> 值		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

注:与健康组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与慢瘀组比较 ▲▲ $P<0.01$ 。

3 讨论

CHD 属于中医“胸痹”的范畴,究其病因虽有血瘀、痰阻、寒凝、气滞之别,但其基本的病机则是“心脉不通”,因此血瘀证是 CHD 最常见的证型(占 87%左右)^[8-9]。自上世纪 60 年代以来,众多学者从脏腑功能、器官形态、生理生化等多方面进行的证候生物学基础研究,初步发现冠心病血瘀证的形成与体内脂质代谢紊乱、凝血功能异常及血管内皮损伤,血液经常处于血栓前高凝状态的病理生理过程相似,这为深入开展 CHD 血瘀证本质研究奠定了一定的基础。然而,这些通过生物学研究所反映的信息,大部分只能观察到与 CHD 血瘀证相关联的指标,难于寻找到病证的特征性或特异性的指标,而且在重复性验证时也常易出现较大的偏差。究其原因,是因为中医证候也是一个涉及到多种物质的含量、结构、功能及其相互关系的复杂系统,难于用

单一的生理学或生化学指标来表达^[5]。既往以还原论为理论基础的研究模式忽略了 CHD 血瘀证病体本身的复杂特性,故难于全面阐释 CHD 血瘀证发生发展的机理和过程^[10]。而以“计算”为先导的系统生物学(Systems Biology),强调了“计算与实验”的交融,揭示系统内部组成部分的相互作用和生物学网络的运行规律,因此已经成为当前中医证候本质研究备受关注的热点。CHD 血瘀证属于复杂性状病证,应该引入系统生物学开展研究,才有可能从整体上有效地揭示其病证的内在本质。

心脏是个高耗能的器官,需要充足的血氧提供能量以维持其正常的功能。心肌缺血使心肌细胞氧供和氧耗之间失去平衡,致使线粒体生成 ATP 减少,葡萄糖无氧酵解增加,乳酸堆积及细胞酸中毒。因此有学者认为心肌缺血是一种代谢性疾病,而对于心肌细胞能量代谢网络调控的研究一直是学术界心血管疾病机理研究的焦点^[11]。CHD 血瘀证的基

本病理是心肌缺血,其发病与心肌细胞能量代谢障碍有密切关系,在系统生物学指导下开展 CHD 血瘀证心肌细胞能量代谢网络及其数学模型的研究,揭示心肌能量代谢网络在 CHD 血瘀证状态下的变化规律,不仅有助于整体上动态分析 CHD 血瘀证形成的过程及其机理,对于中医病证的系统生物学研究也具有一定的启示意义。

陈可冀院士、史载祥教授主编的《实用血瘀证学》认为,按血瘀证起病骤缓可分为急、慢性血瘀证^[2]。临床上,稳定劳力型心绞痛多属于 CHD 慢性心血瘀阻证,而急性心肌梗死多为 CHD 急性心血瘀阻证。本项目是在系统生物学指导下,基于 FluxExplorer 平台开展 CHD 心血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型的实验研究,通过流平衡分析(FBA)以从整体上探讨 CHD 急性、慢性心血瘀证状态下的能量代谢变化特点。

本项研究表明,将三组大鼠冠脉血液中葡萄糖、脂肪酸和血氧检测结果输入 CHD 心血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型中,经过 FBA 显示,CHD 急、慢性心血瘀阻证组与健康大鼠的糖酵解、脂代谢和三羧酸循环均已被激活(网络中粉红色部分),但乳酸代谢等并未启动(网络中仍呈黑色部分),提示由于心肌是线粒体极其丰富的组织,虽然血瘀证两组冠脉中血氧相对减少(本文急、慢性血瘀组分别为健康组血氧含量的 45.39%和 65.08%),但冠脉中葡萄糖、脂肪酸等能源物质亦相对不足,故仍几乎被完全氧化而未产生过多乳酸,而是在相对低水平状况下(本文急、慢性血瘀组分别为健康组 ATP 产量的 45.68%和 65.75%)维持心脏搏动所需要的能量供应。

德国化学家米契里斯(Michaelis)和门坦(Menten)根据代谢中间产物学说推导出酶促反应速度的方程式,指出能量代谢酶促反应的速度与酶的初始浓度成正比。本项研究也观察到,健康对照组、CHD 慢瘀证组、CHD 急瘀证组三组中心肌细胞能量代谢的 ATP 的产量呈递减的趋势,这与三组中糖酵解的关键酶(HK、pfk、PK)、三羧酸循环的关键酶(Cs、Icdh、Ocd)的浓度呈一致性变化,这从一个侧面阐释 CHD 急性血瘀和慢性血瘀不同证候的形成可能与机体内促进能量代谢的关键酶的浓度(活性)有一定的关联。

本项研究中采用的 CHD 急性血瘀证和 CHD 慢性血瘀证模型与 Liu B、Clana chan AS、Schulz R 等报道的“心肌灌注缺血模型”特征相近^[13]。CHD 急

性血瘀证模型类似“无灌注缺血模型(no-flow ischemia),由于心脏梗阻的局部没有血流灌注,血氧缺少,代谢终产物在胞浆中积聚,能量代谢的关键酶的活性降低,葡萄糖、脂肪酸等摄取受到抑制,糖酵解底物的主要来源为糖元降解;CHD 慢性血瘀证模型类似”低灌注缺血模型(low-flow ischemia),心脏受到持续低流量灌注,一方面可抑制强烈的心肌收缩,减少耗能,另一方面大部分代谢终产物可以被血流带走,故其能量代谢的关键酶的活性减低,葡萄糖、脂肪酸等摄取受到一定的抑制,但其糖酵解增强。本项研究中的三组糖酵解和三羧酸循环的关键酶及能源物质结果分析证实了上述观点,提示 CHD 不同血瘀证候的形成与机体内心肌细胞能量代谢的水平密切相关,所研制的“CHD 急性、慢性血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型”为从系统生物学角度研究 CHD 血瘀证本质提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Swertz MA, Jansen RC. Beyond standardization:dynamic Software infrastructures for systems biology[J]. Nat Rev Genet,2007,8:235-243.
- [4] Varma A, Palsson BO. Parametric sensitivity of stoichiometric flux balance models applied to wild-type Escherichia coli metabolism [J]. Biotechn. Bioeng. 1994,45:69-79.
- [5] Luo RY, Liao S, Tao GY, et al. Dynamic analysis of optimality in myocardial energy metabolism under normal and ischemic conditions[J]. Mol Syst Biol,2006,2:0031.
- [6] 王阶,李海霞,胡元会,等.血瘀证量化诊断方法学研究[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(9):658-661.
- [7] 郑小伟,郑东升.心血瘀阻证模型.见袁肇凯主编.中医诊断实验方法学(第2版)[M].北京:科学出版社,2007:257-258.
- [8] 张丽娜.冠心病血瘀证机理研究解析[J].实用中医内科杂志,2008,22(5):24-25.
- [9] 李琳,胡志希,李杰,等.冠心病及其血瘀证遗传学研究进展[J].湖南中医药大学学报,2013,33(11):101-103.
- [10] 盛海辉.冠心病易感基因的筛选[J].生理科学进展,2004,35(2):130-134.
- [11] Athes Y, Gamier A, Fortin D, et al. Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat [J]. Relevance to heart failure[J]. Eur J Physiol,2007,455(3):431-442.
- [12] 陈可冀,史载祥.实用血瘀证学[M].北京:人民卫生出版社,1999:14-15.
- [13] Liu B, Clana chan AS, Schulz R, et al. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons[J]. Circ Res,1996,79:940-948.