

## ·血瘀证治·

本文引用:刘培,肖隋熙,罗颖,胡伟,简维雄,李杰.心血瘀阻证动态演变过程生物信息学研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):130-135.

## 心血瘀阻证动态演变过程生物信息学研究

刘培<sup>1</sup>,肖隋熙<sup>1</sup>,罗颖<sup>2</sup>,胡伟<sup>2</sup>,简维雄<sup>1\*</sup>,李杰<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

**〔摘要〕**目的 探讨冠心病心血瘀阻证动态演变过程中血瘀证前期、亚血瘀证期、心血瘀阻证期3个阶段的代谢组学通路。方法 信号通路分析采用KEGG,代谢产物分子注释、相关的酶或转运蛋白及其相关性分析采用HMDB,代谢产物路径可视化采用metPA网络软件。结果 用MetPA分析的生物代谢通路显示,12个代谢产物参与了22条代谢路径。其中6条通路(氨酰-tRNA生物合成、缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成、缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成及降解、精氨酸和脯氨酸代谢、半乳糖代谢、D-精氨酸与D-鸟氨酸代谢)的影响值 $P<0.05$ 。结论 6条密切相关的通路主要集中在亚血瘀证期和心血瘀阻期。

**〔关键词〕**心血瘀阻证;演变过程;代谢组学

**〔中图分类号〕**R256

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.004

## Research on Dynamic Evolution of Heart Blood Stasis Syndrome Based on Bioinformatics

LIU Pei<sup>1</sup>, XIAO Suixi<sup>1</sup>, LUO Ying<sup>2</sup>, HU Wei<sup>2</sup>, JIAN Weixiong<sup>1\*</sup>, LI Jie<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the three stages of metabolic pathways on early-stage of blood stasis syndrome, sub-stage of blood stasis syndrome and stage of heart blood stasis syndrome during the dynamic evolution of heart blood stasis syndrome in patients with coronary heart disease. **Methods** Signal pathways were analyzed by using KEGG. Molecular annotations of metabolites, related enzymes or transporters and their associated properties were analyzed by using HMDB. Metabolic pathways visualization were analyzed by using metPA network software. **Results** Metabolic pathways showed that 12 metabolites were involved in 22 metabolic pathways. The influence value of 6 pathways (biosynthesis of aminoacyl-tRNA, biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, degradation of valine, leucine and isoleucine, metabolism of arginine and proline, metabolism of galactose, metabolism of D-Arginine and D-ornithine) was  $P<0.05$ . **Conclusion** The six closely related pathways are mainly concentrated in sub-stage of blood stasis syndrome and stage of heart blood stasis syndrome.

**〔Keywords〕** heart blood stasis syndrome; dynamic evolution; metabonomics

本项目前期应用代谢组学技术对冠心病血瘀阻证进行了不同阶段小分子代谢产物的研究,从血瘀证前期、亚血瘀证期、心血瘀阻证期3个阶段代谢通路的角度解释其生物学机制。前期运用GS-MS对3

个阶段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),鉴定出32种代谢产物中与心血瘀阻证形成过程密切相关依次是柠

**〔收稿日期〕**2017-11-20

**〔基金项目〕**国家自然科学基金项目(81202647,81774207,81673963);国家重点学科项目(2014-16);湖南省中医药科研计划项目(201427);中国博士后基金资助(2013M530355)。

**〔作者简介〕**刘培,女,在读硕士研究生,研究方向:心病中医证治机制研究。

**〔通讯作者〕**\* 简维雄,男,博士,副教授,E-mail:86461822@qq.com;\* 李杰,男,博士,教授,E-mail:317768870@qq.com。

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<sup>[1-5]</sup>。同时确定此 12 种代谢产物为代谢产物谱,并在此基础上,采用 MetaboAnalyst、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、HMDB (The Human Metabolome Database) 数据库等信息进行分析,具体内容如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 代谢谱来源于本课题前期实验结果

在 32 种代谢产物中与心血瘀阻证形成过程中密切相关的柠檬酸、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、甘露糖为代谢产物谱。

### 1.2 分析软件信号通路分析

采用 KEGG(<http://www.genome.jp>)进行代谢产物分子注释;相关的酶、转运蛋白及其相关性分析采用 MetaboAnalyst 3.0 网络软件(<http://www.metaboanalyst.ca>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 代谢组产物检索匹配情况

对与心血瘀阻动态演变过程密切相关的 12 种产物在 KEGG 与 HMDB 中检索,相对应的 ID 号见表 1。

### 2.2 代谢产物路径分析

用 MetaboAnalyst 分析的生物代谢通路显示,12 个代谢产物参与了 22 条代谢路径,其中包含氨酰-tRNA 生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、缬氨

酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、半乳糖代谢、D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢、亚油酸代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)、糖酵解或葡萄糖生成、丙酮酸代谢、丙酸代谢、谷胱甘肽代谢、肌醇磷酸盐代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、原代胆汁酸生物合成、果糖和甘露糖代谢、脂肪酸生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、嘧啶代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、嘌呤代谢、类固醇激素生物合成。

通路见表 2 和图 1。表中代谢通路影响值通过拓扑分析计算得到,选出了 6 条 P 值小于 0.05 的代谢通路作为与心血瘀阻证动态演变过程密切相关的通路。分别是氨酰-tRNA 生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、半乳糖代谢、D-精氨酸与 D-鸟氨酸代谢 6 条影响值较高通路的详细结构见图 2-图 7,结果显示这些代谢物在动态演变过程中有明显的扰动,对血瘀证有明显影响。通过通路分析可以全局性地描绘出生物信息学的变化,以及损伤的潜在机制。

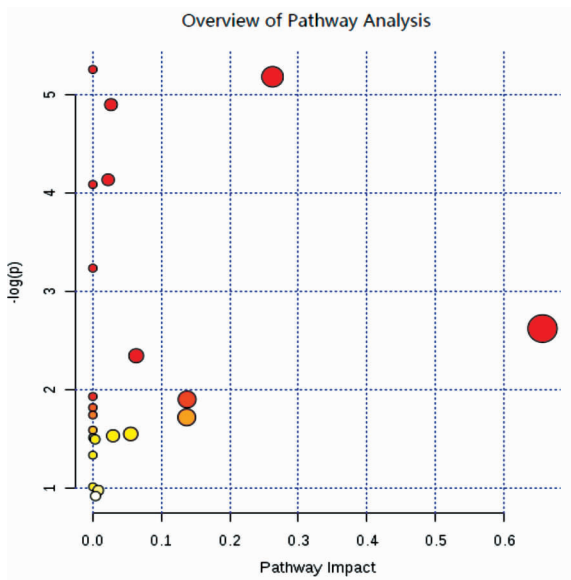
图 2 所示亮氨酸和异亮氨酸参与此通路中的缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,脯氨酸参与此通路中的精氨酸脯氨酸代谢反应。每种 tRNA 分子与相应的氨基酸结合,然后将这些氨基酸运送到核糖体进行蛋白质合成。连接反应的第一步是在合成酶的作用下,ATP 分子和相对应的氨基酸(或其前体)结合形成氨酰-AMP(腺苷酸),并释放出无机焦磷酸(PPi)。然后酶与氨酰-AMP 复合物再与正确的 tRNA 分子结合,催化氨基酸从氨酰-ATP 转移到 tRNA 的 3'端最后一个碱基的 2-或 3-羟基上。

表 1 冠心病心血瘀阻证代谢组产物基本注释表

代谢物通用名	HMDB ID	KEGG ID	参与通路个数	相关酶个数	转运蛋白个数
Citric acid	HMDB00094	C00158	15	24	1
Cholesterol	HMDB00067	C00187	41	17	2
Ornithine	HMDB00214	C00077	20	19	0
L-Proline	HMDB00162	C00148	45	29	1
L-Isoleucine	HMDB00172	C00407	48	6	1
Stearic acid	HMDB00827	C01530	2	17	1
L-Lactic acid	HMDB00190	C00186	16	5	0
Urea	HMDB00249	C00086	48	10	2
L-Leucine	HMDB00687	C00123	50	7	1
Linoleic acid	HMDB00673	C01595	1	52	0
D-Mannose	HMDB00169	C00159	5	50	0
Myoinositol	HMDB00211	C00137	6	7	0

表 2 通过 MetPA 得到的独特的通路分析结果

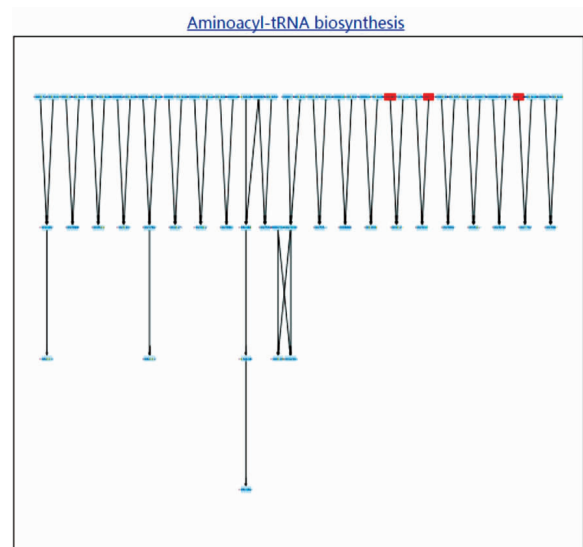
通路名	化合物总数	匹配个数	Raw p	Impact	Details
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	3	0.0052215	0	KEGG
Arginine and proline metabolism	77	3	0.0056244	0.26223	KEGG
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	2	0.0074642	0.0265	KEGG
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	2	0.016	0.02232	KEGG
Galactose metabolism	41	2	0.016774	0	KEGG
D-Arginine and D-ornithine metabolism	8	1	0.039251	0	KEGG
Linoleic acid metabolism	15	1	0.072431	0.65625	KEGG
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	0.095485	0.06327	KEGG
Glycolysis or Gluconeogenesis	31	1	0.14437	0	KEGG
Pyruvate metabolism	32	1	0.14869	0.13756	KEGG
Propanoate metabolism	35	1	0.16153	0	KEGG
Glutathione metabolism	38	1	0.1742	0	KEGG
Inositol phosphate metabolism	39	1	0.17838	0.13703	KEGG
Ascorbate and aldarate metabolism	45	1	0.20307	0	KEGG
Primary bile acid biosynthesis	47	1	0.21115	0.05524	KEGG
Fructose and mannose metabolism	48	1	0.21516	0.02948	KEGG
Fatty acid biosynthesis	49	1	0.21916	0	KEGG
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	1	0.22313	0.00326	KEGG
Pyrimidine metabolism	60	1	0.26186	0	KEGG
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	1	0.36109	0	KEGG
Purine metabolism	92	1	0.37422	0.00794	KEGG



横坐标是通路影响值,纵坐标是 $-\log(P)$

图 1 通过 MetPA 得到的通路分析概要图

图 3 所示瓜氨酸和 L-天冬氨酸在酶的作用下转为精氨基琥珀酸,精氨基琥珀酸继而分解为 L-精氨酸、N-乙酰鸟氨酸。L-精氨酸在精氨酸酶的激活下生成尿素并与 N-乙酰鸟氨酸结合转为鸟氨酸,鸟氨酸在鸟氨酸环化酶的激活下和肽在脯氨酸亚氨基肽酶的作用下共同反应生成脯氨酸。

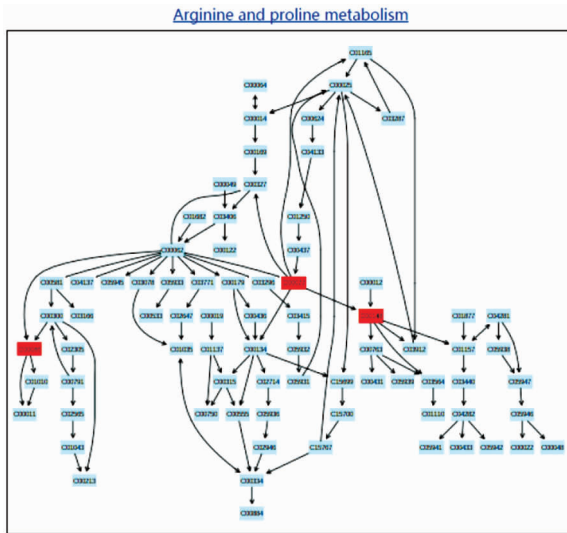


(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)

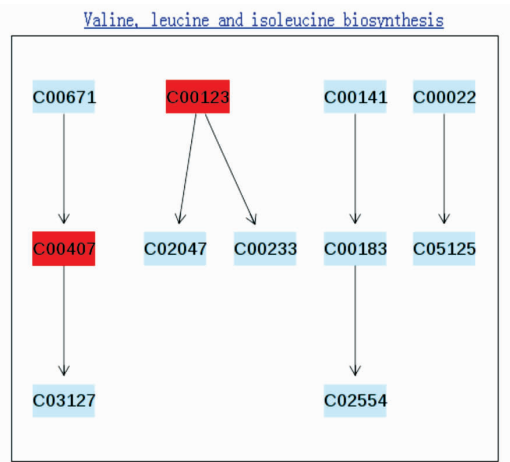
图 2 Aminoacyl-tRNA biosynthesis 代谢通路的结构图

图 4 所示(3s)-3-甲基-2 氧代戊酸通过支链氨基酸氨基转移酶和亮氨酸脱氢酶的共同作用转化为 L-异亮氨酸,L-异亮氨酸再转为 L-异亮氨酰-tRNA。L-亮氨酸则分解为 L-亮氨酰-tRNA 和酮二亮氨酸。

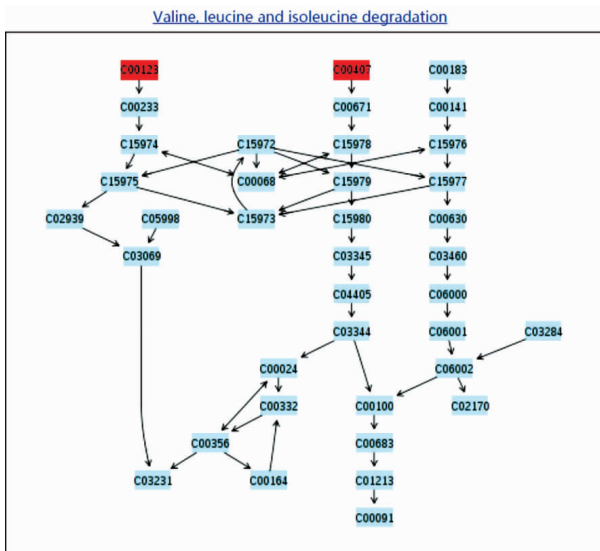
图 5 所示亮氨酸在支链氨基酸氨基转移酶、亮氨酸脱氢酶和亮氨酸转移酶的共同作用下生成酮二



(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)  
图 3 Arginine and proline metabolism 代谢通路的结构图

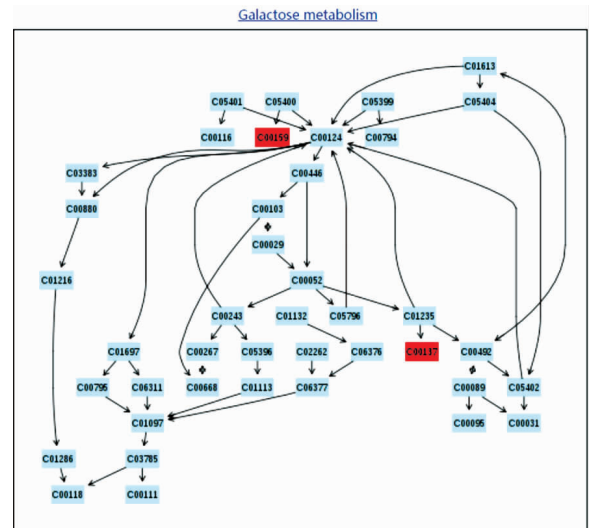


(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)  
图 4 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis 代谢通路的结构图



(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)  
图 5 Valine, leucine and isoleucine degradation 代谢通路的结构图

亮氨酸,酮二亮氨酸继而生成 3-甲基-1-羟基丁基-THPP。支链氨基酸氨基转移酶激活异亮氨酸为(3 s)

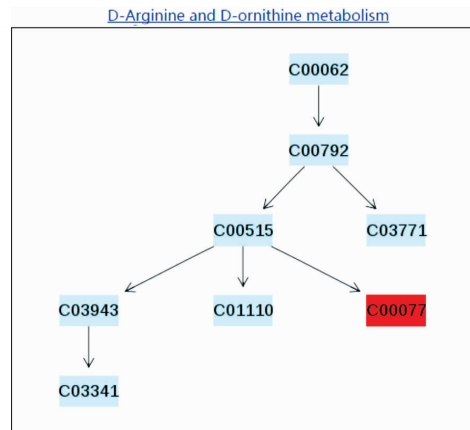


(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)

图 6 Galactose metabolism 代谢通路的结构图

-3-甲基-2 氧代戊酸。

图 6 所示半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶、尿苷二磷酸半乳糖-4-差向酶及其所催化的酶促反应转为葡萄糖而被利用。此外半乳糖还可以



(图中所示为 KEGG ID,深色的即为本研究结果中参与代谢产物)

图 7 D-Arginine and D-ornithine metabolism 代谢通路的结构图

通过代谢旁路还原为半乳糖醇或氧化为半乳糖酸。

图 7 所示 L-精氨酸在精氨酸消旋酶的激活下生成 D-精氨酸,D-精氨酸可分解为 D-鸟氨酸和 2-Oxoarginine,D-鸟氨酸是 D-精氨酸在 D-精氨酸酶的激活下生成。D-鸟氨酸在精氨酸消旋酶、鸟氨酸消旋酶和 L-氨基酸消旋酶的激活下可分解为鸟氨酸,在 D-氨基酸氧化酶的激活下可分解为 5-氨基-

2-氧代戊酸,亦可在酶的激活下生成(2R,4S)-2,4-Diaminopentanoate。

### 3 讨论

在心血瘀阻证动态演变过程中,12种代谢产物共对应到KEGG中22条通路,其中6条显著富集。在显著通路中涉及到了7种蛋白。

在精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and proline metabolism)通路中有鸟氨酸、尿素和脯氨酸参与。精氨酸代谢紊乱,血浆精氨酸水平随动脉粥样硬化进展而变化<sup>[6]</sup>。在动脉粥样硬化进展(动物模型)或对ACS(人)的响应中显著改变的发现的代谢物代谢途径分析中。常见的途径是精氨酸和脯氨酸和谷胱甘肽代谢。多胺腐胺和亚精胺由鸟氨酸产生。该途径抑制血小板聚集,并且它们的增量与动脉损伤密切相关,因为它们有助于血管损伤部位的动脉重塑。尤其是,分别有精氨酸和NOS(一氧化氮合酶)之间的精氨酸有两种有利于NO(一氧化氮)或鸟氨酸生产(多胺和脯氨酸的前体)的竞争机制。从而引起内膜增厚的发生<sup>[7]</sup>。

在D-精氨酸与D-鸟氨酸代谢(D-Arginine and D-ornithine metabolism)通路中有鸟氨酸参与。该途径描述了D-氨基酸氧化酶将D-氨基酸通常转化为氧化氨基酸。D-氨基酸可以在一些细菌中发现,或者可以通过异构酶/变位酶反应自发形成<sup>[8]</sup>。动脉粥样硬化其特征在于动脉壁内动脉粥样硬化斑块的持续积累<sup>[9]</sup>。在冠状动脉粥样硬化期,脂质复合糖类积聚,出血及血栓形成,纤维组织增生,钙盐沉着。该路径与脂质沉积有着密切关系。

在氨酰-tRNA生物合成(Aminoacyl-tRNA biosynthesis)通路中有亮氨酸和异亮氨酸及脯氨酸参与。氨酰-tRNA合成影响蛋白质的合成,从而严重影响心肌组织的分泌、酶合成、蛋白合成、细胞增殖等等重要功能<sup>[10]</sup>。在心肌缺血期,心肌能量代谢不正常。脂肪酸摄取降低、葡萄糖代谢增强。亮氨酸增加了该组织中的BCKD活性,提高了肝中的异亮氨酸和缬氨酸氧化,当能量供应低时,它也可以作为葡萄糖合成的碳供体<sup>[11]</sup>。可以通过该途径可产生更多的葡萄糖。

在缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成(Valine, leucine and isoleucine biosynthesis)和缬氨酸,亮氨酸

和异亮氨酸降解(Valine, leucine and isoleucine degradation)通路中有亮氨酸和异亮氨酸参与。肌肉不是糖原生成的组织;因此,如果将缬氨酸和异亮氨酸转化为葡萄糖,则不能在该组织中完全氧化<sup>[12]</sup>。

然而,亮氨酸似乎通过通过葡萄糖-丙氨酸循环刺激葡萄糖再循环来调节骨骼肌的葡萄糖的氧化应用<sup>[13]</sup>。这通过转氨酶过程发生,其涉及通过酶支链氨基转移酶将氨基可逆转移到 $\alpha$ -酮戊二酸盐,产生谷氨酸。然后通过丙酮酸氨基转移酶将谷氨酸转氨酶,将其氨基从谷氨酸转移到产生丙氨酸的丙酮酸。然后,丙氨酸从肌肉组织(肝脏)中代谢产生葡萄糖(图1)<sup>[11-12]</sup>。这些机制产生蛋白质保存,并在能量限制期间提供具有低胰岛素反应的稳定的葡萄糖环境<sup>[14-15]</sup>。两条通路有利于葡萄糖代谢的调节。

在半乳糖代谢(Galactose metabolism)通路中有甘露酸和肌酸参与,半乳糖是由乳类食物中的乳糖水解而来,其代谢主要是通过半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶、尿苷二磷酸半乳糖-4-差向酶及其所催化的酶促反应转为葡萄糖而被利用。此外半乳糖还可以通过代谢旁路还原为半乳糖醇或氧化为半乳糖酸<sup>[10]</sup>。在急性血瘀证期半乳糖的代谢发挥了重要作用。可能是在心肌缺血期,心肌的血液灌注减少,心肌的供氧减少,心肌能量代谢不正常,需要更多的能量,葡萄糖代谢增强,半乳糖代谢成了提供心肌能量的重要途径。

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<sup>[5]</sup>。在22条通路当中,密切相关的代谢通路主要集中在亚血瘀证期和血瘀证期。精氨酸和脯氨酸代谢、D-精氨酸与D-鸟氨酸代谢在亚血瘀证期发挥了重要影响。氨酰-tRNA生物合成、缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成、缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸降解、半乳糖代谢在心血瘀阻证期起着关键作用。参与22条通路的代谢物主要有亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甘露酸和肌酸、鸟氨酸、尿素。

总之,本项目通过对心血瘀阻证动态演变过程代谢产物通路进行研究,发现演变过程中每一个病理

阶段代谢通路有较大差异。在已知代谢产物的基础上找到了相应的代谢通路和关系密切的代谢产物。这种通路研究为心血瘀阻证的诊断以及治疗提供了新的思维方式和方法<sup>[6]</sup>,在代谢机制的研究中具有很大的潜力,可作为研究中医药作用靶点的依据。

#### 参考文献:

- [1] 简维雄,袁肇凯,黄献平,等.冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J].中国中西医结合杂志,2010,30(6):579-584.
- [2] 简维雄,黄献平,陈清华,等.基于气相色谱-质谱的大鼠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.
- [3] 简维雄,袁肇凯.心血瘀阻证研究思路探讨[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):272-277.
- [4] 简维雄,袁肇凯,胡志希,等.冠心病血瘀证病理演变过程的探索[J].中华中医药学刊,2015,33(7):1551-1554.
- [5] 简维雄,左和宁,刘韶,等.基于代谢组学的心血瘀阻证动态演变过程研究[J].中国中西医结合杂志,2016,36(12):1496-1503.
- [6] DANG V T, HUANG A, ZHONG L H, et al. Comprehensive Plasma Metabolomic Analyses of Atherosclerotic Progression Reveal Alterations in Glycerophospholipid and Sphingolipid Metabolism in Apolipoprotein E-deficient Mice[J]. Scientific Reports, 2016(6):2045-2322.
- [7] MARTIN-LORENZO M, ZUBIRI I, MAROTO A S, et al. KLK1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery[J]. Metabolomics, 2015,11(5):1-12.
- [8] MANGALAM A K, POISSON L M, NEMUTLU E, et al. Profile of circulatory metabolites in a relapsing-remitting animal model of multiple sclerosis using global metabolomics[J]. Journal of clinical & cellular immunology, 2013, 4(3):2155-9899.
- [9] CAMPOS-FERRAZ P L, BOZZA T, NICASTRO H, et al. Distinct effects of leucine or a mixture of the branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine) supplementation on resistance to fatigue, and muscle and liver-glycogen degradation, in trained rats[J]. Nutrition, 2013, 29(11): 1388-1394.
- [10] 吴德坤,郑景辉,张新春,等.基于文献的四逆汤干预心肌梗死模型代谢组的生物信息学分析[J].中药新药与临床药理,2017,28(2): 3-6.
- [11] BROSANAN J T, BROSANAN M E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation[J]. J Nutr, 2006,136(1):207S-211S.
- [12] A J Wagenmakers Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism Exerc Sport Sci Rev, 1998,26: 287-314.
- [13] LAYMAN D K, WALKER D A. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome[J]. J Nutr, 2006, 136(1):319-323.
- [14] LAYMAN D K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis[J]. J Nutr, 2003,133(1):261-267.
- [15] NICASTRO H, ZANCHI N E, DA L C, et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats[J]. Nutrition, 2012,28(4):465-471.
- [16] 袁肇凯,简维雄,黄献平,等.基于冠心病血瘀证心肌细胞能量代谢网络模型的流分衡分析[J].湖南中医药大学学报,2016,36(2):20-24.

(本文编辑 贺慧娥)