

·方药研究·

本文引用:钟森杰,李欣春,李琳,胡志希,简维雄,周瑶,姚涛,杨梦.参麦注射液对高血压心衰大鼠血浆代谢组学的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(9):1068-1072.

参麦注射液对高血压心衰大鼠血浆代谢组学的影响

钟森杰¹,李欣春²,李琳¹,胡志希^{1*},简维雄^{1*},周瑶¹,姚涛¹,杨梦¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.长沙金润中医院,湖南长沙 410014)

[摘要] **目的** 研究参麦注射液对高血压心衰大鼠血浆代谢组学的影响。**方法** 通过8%NaCl高盐饲料喂养Dahl盐敏感性大鼠制造高血压心衰模型,成模大鼠分为模型组、参麦注射液组,并同时设置正常组,干预15 d后,采集正常组、模型组和参麦注射液组大鼠的血浆样本,运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术及多元统计分析进行研究。**结果** 3组的代谢图谱存在显著差异。与正常组相比,模型组19种代谢物水平紊乱;经参麦注射液干预后,亮氨酸、鸟氨酸、丙氨酸、4-羟基-脯氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、蔗糖醇、丙酮酸、尿素浓度向正常方向显著回调,蔗糖酸、半胱氨酸、色氨酸、甲基半胱氨酸、花生四烯酸、胆固醇、木糖醇、核糖醇、焦谷氨酸、丙二酸浓度无显著改变,此外还发现异亮氨酸浓度上升。**结论** 高血压心衰大鼠血浆代谢组学出现变化,参麦注射液能有效改善部分紊乱的代谢物水平,其作用机制与改善糖代谢、氨基酸代谢紊乱,调节支链氨基酸水平相关,未发现有改善脂代谢紊乱的作用。

[关键词] 心力衰竭;高血压;参麦注射液;代谢组学

[中图分类号] R285.5;R541.3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.09.004

Effects of Shenmai Injection on Plasma Metabolomics in Rats with Hypertensive Heart Failure

ZHONG Senjie¹, LI Xinchun², LI Lin¹, HU Zhixi^{1*}, JIAN Weixiong^{1*}, ZHOU Yao¹, YAO Tao¹, YANG Meng¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changsha Jinrun

Hospital of TCM, Changsha, Hunan 410014, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Shenmai Injection on plasma metabolomics in rats with hypertensive heart failure. **Methods** The hypertensive heart failure model was established by continuously feeding Dahl salt-sensitive rats with 8% NaCl diet. After modeling, the rats were randomly divided into model group, Shenmai Injection group and normal group. After 15 d of intervention, plasma samples of the normal group, the model group, and the Shenmai Injection group were collected, and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupling technique and multivariate statistical analysis were applied for the study. **Results** There were significant differences in metabolic patterns of the 3 groups. Compared with the normal group, there were disorders in the levels of 19 metabolites in the model group; the concentrations of leucine, ornithine, alanine, 4-hydroxy-proline, threonine, asparagine, threitol, pyruvic acid and urea intervened by Shenmai Injection were significantly back-regulated towards the normal level, and there were no significant differences in the concentrations of threonic acid, cysteine, tryptophan, methyl cysteine, arachidonic acid, cholesterol, xylitol, ribitol, pyroglutamic acid and malonic acid. In addition, it was found that the concentration of isoleucine was increased. **Conclusion** The changes of plasma metabolomics in heart failure rats with hypertension indicates that Shenmai Injection can effectively improve the levels of some disordered metabolites. The mechanism of Shenmai Injection is related to the improvement of disorders in glucose metabolism and amino acid metabolism, and the regulation of the levels of branched chain amino acid, but no improvement of lipid metabolism disorder is found.

[Keywords] heart failure; hypertension; Shenmai Injection; metabolomics

[收稿日期] 2018-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774208,81774207);湖南省自然科学基金(2018JJ2291,2019JJ50447);湖南省教育厅优秀青年项目(18B235)。

[作者简介] 钟森杰,男,在读博士研究生,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律。

[通讯作者] * 胡志希,男,教授,博士研究生导师,E-mail:515800272@qq.com;简维雄,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:86461822@qq.com。

心衰是各种心脏疾病的终末期,具有并发症多、致死率高的特点,为21世纪最重要的慢性心血管病症^[1]。高血压病作为常见的心血管疾病,是心衰的高危因素,最新临床流行病学调查^[2]显示:男性39%和女性59%的心衰发生可归因于高血压。高血压患者由于血压长期增高,导致血管壁、心脏压力负荷增大,引起血管平滑肌增生及心肌纤维化等一系列病理变化,最终导致心脏等靶器官损害,收缩和舒张功能降低,从而引发心衰^[3-4]。

前期研究发现,参麦注射液能有效改善高血压心衰大鼠的心功能、血流动力学指标和心肌组织形态,展现出良好的治疗效果^[5]。本实验利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术及多元统计分析,从生物学角度探讨参麦注射液治疗心衰的作用机制,为心衰的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Dahl 盐敏感性大鼠 25 只,体质量(220±10)g,北京维通利华实验动物有限公司提供(合格证编号:11400700134072),湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室内饲养。

1.2 主要药物与试剂

主要药物:参麦注射液(规格:20 mL/瓶),杭州正大青春宝药业公司生产(批号:1402225)。

主要试剂:甲醇(沃凯,上海);2-氯苯丙氨酸(Aladdin,美国);十七碳酸(Aladdin,美国);甲氧基胺盐酸盐(TCI,日本);衍生化试剂(含1%三甲基氯硅烷的BSTFA试剂,日本TCI公司提供)。

1.3 主要仪器设备

Forma 900 系列超低温冰箱(Thermo,美国);7890A 型气相色谱仪、5975C 型质谱仪(Agilent,美国);BP-2010A 型智能无创大鼠血压计(Softron,北京);QL-866 型混匀仪(Vortex Mixer,美国);SonoScape-S2N 型彩色多普勒超声诊断仪(开立,深圳);H1650-W 型冷冻离心机、53050 型真空浓缩仪(Eppendorf,德国)。

1.4 动物模型制备

1.4.1 造模方法 随机选取 8 只大鼠为正常组,其余均为造模组。根据课题组文献报导的方法^[6]研制高血压心衰大鼠模型,正常组予 0.3%NaCl 低盐饲料喂养,造模组予 8%NaCl 高盐饲料喂养,喂养 20 周。

1.4.2 模型评价 每 15 天测量一次大鼠鼠尾血压,

发现造模组自喂食高盐饲料后,其鼠尾血压一直大于 140 mmHg,确定已成高血压模型;而正常组血压基本维持在 140 mmHg 以下,尚未达到高血压诊断指标,难以构成心脏器质性病变。喂养 20 周后,造模组大鼠死亡 2 只,对两组大鼠进行超声心动图检查和血清氨基末端脑钠肽前体(N Terminal-pro brain natriuretic peptide, NT-proBNP)含量检测,发现与正常组相比,造模组左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(fraction shortening, FS)、NT-proBNP 含量均有显著差异,具体见表 1。参照本课题组的文献报导^[5-6],评定造模组大鼠模型成立。

表 1 两组大鼠 LVEF、FS 和 NT-proBNP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVEF/%	FS/%	NT-proBNP/(pg·mL ⁻¹)
正常组	8	82.50±3.20	47.88±6.03	146.63±17.60
造模组	15	74.87±2.99*	36.07±5.19*	315.67±28.51*

注:与正常组比较,*P<0.01

1.5 分组给药

造模成功大鼠 15 只,按随机数字表法分为模型组(7 只)和参麦注射液组(8 只)。经过人与动物等效剂量换算(人体质量 60 kg),参麦注射液组的每次给药剂量为 6.0 mL/kg,每天 1 次,通过腹腔注射方式给药,给药 15 d。

1.6 血浆样本采集

对所有大鼠进行腹主动脉取血,取血完毕后常温静置 20 min,4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min,提取上清液,保存于-80 ℃冰箱中。

1.7 GC-MS 检测

实验时将所有样本在 4℃下融化,每个样本各取 100 μL 于 1.5 mL 离心管,进行预处理:(1)加入 400 μL 甲醇,振荡 60 s;(2)加入内标(60 μL 2-氯苯丙氨酸、60 μL 十七碳酸),涡旋振荡 60 s;(3)4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至新离心管中,并用真空离心浓缩仪浓缩。

完成上述步骤后,对样本进行衍生化处理。GC-MS 适用于检测挥发性较好的代谢物,对于含有羧基、羟基、氨基等的代谢物,可以通过衍生化的方法增加其挥发性。具体步骤如下:(1)脎化处理:加入 60 μL 甲氧基溶液,涡旋振荡 30 s,37 ℃反应 2 h;(2)硅烷化处理:加入 60 μL 衍生化试剂,37 ℃反应 90 min;(3)4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,提

取上清液,进行GC-MS检测。

GC-MS条件:气相色谱采用HP-5MS毛细管柱以1 mL/min的恒流氦气来分离衍生物质,1 μ L样品以分流比20:1的方式通过自动进样器注入。注射温度为280 $^{\circ}$ C,接口设置为150 $^{\circ}$ C和离子源调整到230 $^{\circ}$ C。升温程序以60 $^{\circ}$ C为初始温度,持续2 min,以10 $^{\circ}$ C/min的速率上升到300 $^{\circ}$ C,并在300 $^{\circ}$ C停留5 min。质谱采用的是范围从35~750 m/z的全扫描方法。

1.8 数据预处理

GC-MS分析后得到可供生物信息学分析的原始数据,通过G1701 MSD ChemStation软件将数据转为netCDF格式(xcms输入文件格式),利用R(v3.1.3)的XCMS程序包进行峰识别、峰过滤、峰对齐,获得包括质核比、保留时间及峰面积等信息的数据矩阵。参照NIST商业数据库和Wiley Registry代谢组数据库,结合AMDIS程序注释代谢物。

1.9 统计分析方法

应用SIMCA-P(v13.0)软件,组间模式识别采用主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA),根据结果构建相应的得分图。差异代谢物的筛选采用正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),根据OPLS-DA模型的VIP值(第一主成分变量重要性值),结合单因素方差分析的P值,以VIP值>1且P<0.05为条件进行筛选。

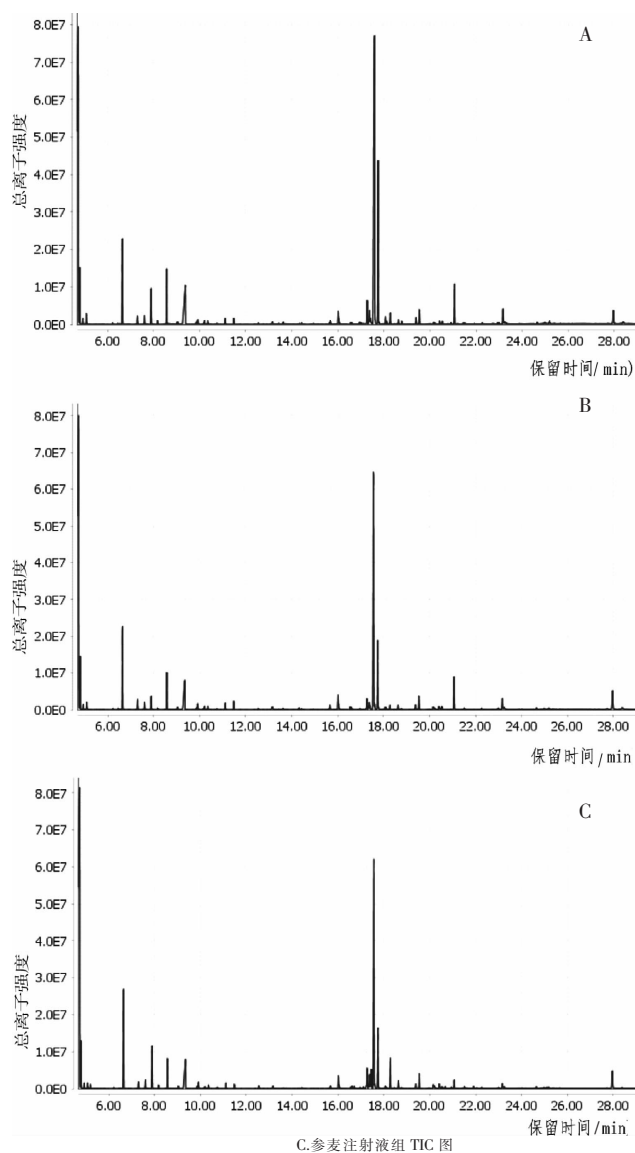
2 结果

2.1 GC-MS分析

3组大鼠GC-MS代表性总离子流色谱图(Total Ion chromatography, TIC)如图1所示。将各组TIC导入数据库选择出匹配度较好的内源性代谢物85种,进行后续的多元统计分析(PCA、PLS-DA、OPLS-DA)。

2.2 模式识别

通过PCA和PLS-DA分析后,得到相应的得分图,见图2。得分图中每一点代表一个样本的代谢成分积分点,越靠近的样本点,表明两者之间代谢差异越小;越远离的样本点,表明两者之间代谢差异越大。PCA得分图和PLS-DA得分图显示3组的样本点虽有交叉点,但仍能看出在空间分布上明显分开,分离程度较好,表明3组间的代谢模式存在差异。



注:A.正常组;B.模型组;C.参麦注射液组

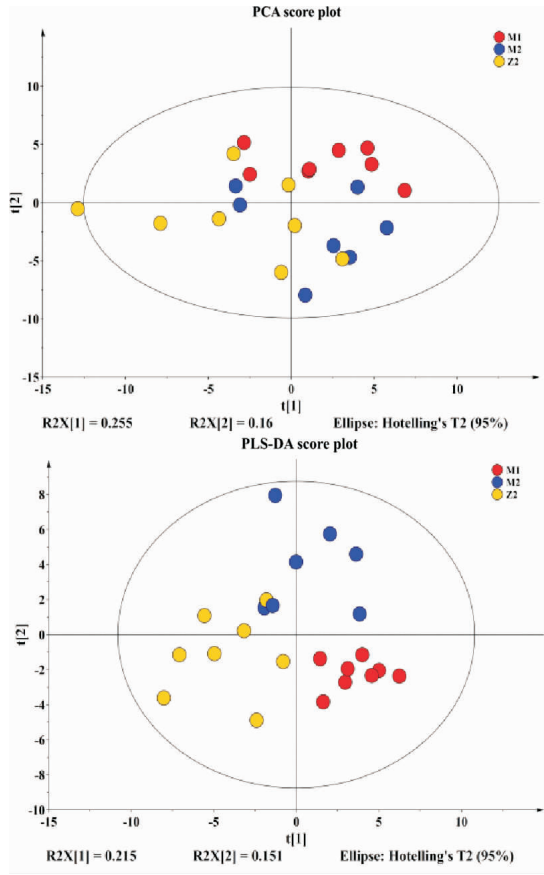
图1 3组大鼠TIC图

2.3 差异代谢物筛选

通过OPLS-DA对组间差异代谢物进行分析,结合单因素方差分析的结果,确定以下19种代谢物对模型组和正常组的分类贡献较大,同时通过KEGG通路数据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)明确与其相关的代谢途径。利用这19种代谢物作为潜在的药物靶标,发现参麦注射液组中9种代谢物水平向正常方向回调,其余10种代谢物水平无显著变化,此外还发现异亮氨酸浓度上升。具体见表2。

3 讨论

参麦注射液源自古方生脉散,主要成分为人参和麦冬的提取物,具有益气复脉、养阴生津的功效,临床上应用于心衰等众多心血管疾病的治疗^[7]。现代研究发现,参麦注射液对心衰的作用机制与改善



注:M1 为正常组(红点),M2 为模型组(蓝点),Z2 为参麦注射液组(黄点)。上为 PCA,下为 PLS-DA

图 2 3 组大鼠的 PCA、PLS-DA 得分图

心肌舒缩功能和血流动力学、调控神经内分泌及细胞因子、改善心肌复极、改善心率变异性等有关,表现出多靶点的作用特点。代谢组学致力于考察生物体在不同状态下内源性代谢产物种类、数量及变化规律,从而揭示代谢物与病理生理、药物作用的关联性。代谢组学技术的发展,为探索参麦注射液治疗心衰的作用机制提供了新的工具和方法,有望发现新的治疗靶点。

与正常组比较,模型组血浆中有 19 种代谢物水平出现明显变化,可能为该模型的生物标志物。在此基础上,利用这些差异代谢物作为潜在的药物靶标进一步研究参麦注射液的作用机制。结果发现与模型组比较,参麦注射液组血浆中有 9 种代谢物水平向正常方向显著回调和异亮氨酸浓度上升,提示参麦注射液对部分代谢紊乱的调节作用,可能是其治疗心衰的作用机制之一。

现代研究表明,正常心脏主要依靠脂肪酸、葡萄糖和乳酸氧化供能,氨基酸的供能只占总能量的 1%,心肌供能的变化可直接或间接导致心衰,这一过程被称为“代谢重构”^[8]。模型组出现显著的氨基酸代谢紊乱,是因为心衰时机体的脂、糖代谢氧化供能障碍,需要动员氨基酸代谢以增强供能^[9]。本研究

表 2 组间差异代谢物筛选结果

序号	代谢物	途径	与正常组比较模型组浓度	与模型组比较参麦组浓度
1	苏糖酸	氨基酸生物合成	↑	-
2	半胱氨酸	氨基酸生物合成	↑	-
3	色氨酸	氨基酸生物合成	↓	-
4	亮氨酸	支链氨基酸降解	↓	↑
5	鸟氨酸	氨基酸生物合成	↑	↓
6	丙氨酸	氨基酸代谢/糖异生	↑	↓
7	4-羟基-脯氨酸	氨基酸生物合成	↑	↓
8	苏氨酸	氨基酸生物合成	↑	↓
9	甲基半胱氨酸	氨基酸生物合成	↑	-
10	天冬酰胺	氨基酸生物合成	↑	↓
11	花生四烯酸	不饱和脂肪酸代谢	↑	-
12	胆固醇	脂肪的消化和吸收	↑	-
13	苏糖醇	果糖和甘露糖代谢	↑	↓
14	木糖醇	戊糖、葡萄糖醛酸转换	↓	-
15	核糖醇	戊糖、葡萄糖醛酸转换	↓	-
16	丙酮酸	糖酵解途径	↑	↓
17	焦谷氨酸	有机酸代谢	↑	-
18	丙二酸	磷酸肌醇代谢	↓	-
19	尿素	鸟氨酸循环	↓	↑
20	异亮氨酸	支链氨基酸降解	-	↑

注:“↑”表示浓度上升,“↓”表示浓度下降,“-”表示差异无统计学意义

发现参麦注射液对氨基酸代谢紊乱具有调节作用,主要体现在鸟氨酸、丙氨酸、4-羟基-脯氨酸、苏氨酸、天冬酰胺水平下调,以及亮氨酸、异亮氨酸水平上调。

亮氨酸、异亮氨酸属于支链氨基酸(BCAAs),具有重要的供能作用。有研究^[10]认为 BCAAs 在心肌应激时能加速分解以供给能量,促进心肌的蛋白质合成,减轻心肌的应激损伤;赵晓丽等^[8]发现 BCAAs 对衰竭心脏具有保护作用,主要作用机制与促进衰竭心脏的蛋白质合成、加强心脏的糖异生、调节心肌能量代谢等相关,并认为给予机体适度补充 BCAAs 可以增加衰竭心脏的心肌能量供应、改善心功能。本研究发现参麦注射液组的亮氨酸、异亮氨酸水平上调,提示该药物通过调节 BCAAs 起到保护衰竭心脏的作用。

丙酮酸是糖酵解途径的产物,其水平异常提示模型组大鼠处于无氧糖酵解的应急代谢状态,能量代谢效率降低^[11]。丙氨酸可通过糖异生途径转化为葡萄糖,苏糖醇为多元醇类代谢物,可通过不同途径参与糖类代谢中。上述代谢物的水平异常反映了模型组大鼠的糖代谢紊乱存在。参麦注射液组中丙氨酸、丙酮酸、苏糖醇水平显著回调,提示参麦注射液能有效调节糖代谢功能,机体的糖异生、糖酵解等代谢功能被过度激活的应急代谢状态得到改善。

花生四烯酸是人体中分布最广的多不饱和脂肪酸,具有酯化胆固醇、增加血管弹性等作用^[12];胆固醇作为体内最丰富的类固醇化合物,是血脂的重要组成部分,花生四烯酸和胆固醇的水平上升提示模型组大鼠出现脂代谢紊乱,引起脂质堆积^[13-14]。经参麦注射液干预后上述两种代谢物的水平未出现显著回调,提示该药物治疗心衰的作用机制可能与调节脂代谢无关。

本研究结果表明,与模型组相比,参麦注射液组的血浆代谢物水平更接近正常组。通过明确与差异代谢物相关的代谢途径,揭示了参麦注射液对心衰

的干预机制与改善糖代谢、氨基酸代谢紊乱,调节支链氨基酸,从而改善心脏能量代谢有关,未发现调节脂代谢紊乱的相关证据。

参考文献

- [1] 金雪娟,周京敏,葛均波.心力衰竭流行病学研究进展[J].中国临床医学,2013,20(6):852-855.
- [2] OOSTEROM-CALO R, VAN BALLEGOOIJEN A J, TERWEE C B, et al. Determinants of adherence to heart failure medication: A systematic literature review[J]. Heart Fail Reviews, 2013,18(4): 409-427.
- [3] KRUEGER K, BOTERMANN L, SCHORR S G, et al. Age-related medication adherence in patients with chronic heart failure: A systematic literature review[J]. International Journal of Cardiology,2015,18(4):728-735.
- [4] 陈可冀,吴宗贵,朱明军,等.慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J].中国中西医结合杂志,2016,36(2):133-141.
- [5] 李欣春,梁昊,胡志希,等.高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):853-857.
- [6] 李欣春,梁昊,胡志希,等.高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):245-248.
- [7] 李盼,王婷,付姝菲,等.基于 Meta 分析的参附、参麦注射液临床作用比较[J].中草药,2016,47(16):2949-2959.
- [8] 赵晓丽.慢性充血性心力衰竭患者血浆支链氨基酸水平的临床研究[D].西安:第四军医大学,2014.
- [9] 钟森杰,李欣春,李杰,等.心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):981-985.
- [10] 梁国荣,曾瑞峰,温丹婷,等.心衰阳虚证血浆氨基酸(缬、苯丙、异亮、亮氨酸)代谢指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2013,28(12):3735-3738.
- [11] 王欢,胡元会,孟浩,等.心复康口服液对心肌梗死后心力衰竭大鼠血浆代谢组学影响的研究[J].北京中医药,2013,32(8):613-617.
- [12] 韦艺丹,许美娟,季晖.花生四烯酸的 ω -羟化代谢途径与心脑血管疾病[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(7):826-833.
- [13] 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.
- [14] 曾繁芳,王丽丽,龙娟,等.血浆总胆固醇水平与急性左心衰患者预后的相关性分析[J].中山大学学报(医学科学版),2017,38(4): 556-560.

(本文编辑 杨 璞)