

本文引用:钟森杰,李静,黄淑敏,杨梦,邱宏,程彬,胡志希,李琳.慢性心衰心气阴虚证模型大鼠的粪便代谢组学研究[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(6): 660-665.

# 慢性心衰心气阴虚证模型大鼠的粪便代谢组学研究

钟森杰,李静,黄淑敏,杨梦,邱宏,程彬,胡志希\*,李琳\*  
(湖南中医药大学中医诊断研究所,湖南长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 研究慢性心衰心气阴虚证大鼠的粪便代谢组学特征。**方法** 13只Dahl盐敏感大鼠随机分为空白对照组(6只)和模型组(7只),以高盐饲料(8%NaCl)饲养模型组大鼠20周复制心衰模型。成模后采集两组大鼠的粪便样本,运用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)联用技术和多元统计分析其代谢成分。**结果** 主成分分析和偏最小二乘判别分析得到的得分图显示,两组的代谢成分积分点完全分离,表明两组大鼠的代谢模式存在明显差异。与空白对照组比较,模型组神经氨酸、尿苷、丙氨酰色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酰甘氨酸、牛磺脱氧胆酸、粪甾烷酸、白三烯E<sub>4</sub>的水平上调,谷氨酸、酪氨酸、烟酸、鞘氨醇、二十四烷酸、二十二碳六烯酸、亚油酸的水平下调。15种差异代谢产物参与了19条代谢通路,其中氮代谢通路和氨酰-tRNA的生物合成通路富集性较显著。**结论** 慢性心衰心气阴虚证大鼠的代谢功能异常,其病理机制涉及氨基酸代谢紊乱、蛋白质代谢紊乱、脂代谢紊乱、炎症反应、肠道功能失衡等多个层面。

**[关键词]** 慢性心衰;心气阴虚证;代谢组学

**[中图分类号]** R285.5;R541.6<sup>+</sup>;969.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.06.004

## Study on Fecal Metabolomics of Heart-Qi Yin Deficiency Syndrome Model Rats of Chronic Heart Failure

ZHONG Senjie, LI Jing, HUANG Shumin, YANG Meng, QIU Hong, CHENG Bin, HU Zhixi\*, LI Lin\*  
(Diagnostic Institute of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the fecal metabolomic characteristics of rats with heart-Qi Yin deficiency syndrome of chronic heart failure. **Methods** Thirteen Dahl salt-sensitive rats were divided into a blank control group (6 rats) and a model group (7 rats). Rats in the model group were fed with high salt diet (8% NaCl) for 20 weeks to replicate the heart failure model. After modeling, fecal samples from the 2 groups of rats were collected, and their metabolic components were analyzed using ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) combined technology and multivariate statistical analysis. **Results** The score chart obtained by principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis showed that the integral point of metabolic components was completely separated between the 2 groups, indicating that there was a significant difference in metabolic pattern between the 2 groups. Compared with the blank control group, the levels of neuraminic acid, uridine, alanyl tryptophan, tyrosinyl valine, phenylalanyl glycine, taurodeoxycholic acid, coprocholic acid and leukotriene E<sub>4</sub> in the model group were up-regulated. The levels of glutamic acid, tyrosine, nicotinic acid, sphingosine, tetracarboxylic acid, docosahexaenoic acid and linoleic acid were down-regulated. 15 different metabolites participated in 19 metabolic pathways. Nitrogen metabolism pathway and aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway had more significant enrichment. **Conclusion** Metabolic

**[收稿日期]** 2019-09-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774208);湖南省自然科学基金项目(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;李琳,女,讲师,E-mail:471920830@qq.com。

function of rats with heart-Qi Yin deficiency syndrome of chronic heart failure was disturbed. Its pathological mechanism involves amino acid metabolism disorder, protein metabolism disorder, lipid metabolism disorder, inflammatory reaction, intestinal dysfunction and other aspects.

[**Keywords**] chronic heart failure; heart-Qi Yin deficiency syndrome; metabolomics

前期研究基于“以方测证”法及一般行为观察,验证高血压心衰大鼠模型属心气阴虚证,构建了可靠的病证结合动物模型,并从血浆代谢组学角度对该模型的生物学基础进行初探<sup>[1-3]</sup>。随着生物信息学研究的深入,已有多项研究发现,肠道微生物及其代谢产物与高血压病、慢性心衰等心血管疾病的发生发展存在密切关联<sup>[4]</sup>。本研究运用基于超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)联用技术观察粪便中代谢产物及相关代谢途径的变化,以期多层次、多角度阐释该病证模型的病理机制及生物学基础,为今后开展心衰的靶向代谢组学及肠道菌群研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

6周龄 Dahl 盐敏感大鼠 13 只,体质量(230±10) g,北京维通利华实验动物有限公司提供,动物合格证号:43004700037714,饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验室内。所有大鼠予常规饲料(0.3%NaCl 浓度)适应性培育至 7 周龄,以随机数字表法分为空白对照组(6 只)和模型组(7 只)。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:JXFSTPRP-24/32 型研磨器(上海净信实业发展有限公司);TGL-16MS 型台式冷冻离心机(上海卢湘仪仪器有限公司);ACQUITY UPLC 型高效液相色谱仪、Xevo G2-XS QToF 型质谱仪(Waters 科技有限公司);BP-2010A 型实验动物血压计(北京 Softron 有限公司);SB-5200DT 型超声清洗器(宁波新芝科技有限公司);SonoScape-S2N 型实验动物超声仪(深圳开立科技有限公司)。

主要试剂:L-2-氯苯丙氨酸(上海恒创生物科技有限公司);甲醇、甲酸、乙腈(上海安谱实验科技公司);所有试剂皆为分析纯、色谱级。

### 1.3 模型制备

模型的制备与验证均依据本课题组的前期研究结果<sup>[1-2]</sup>。空白对照组予常规饲料饲养,模型组予高盐(8%NaCl)饲料饲养,每只每天 20 g 饲料,自由取水,共饲养 20 周。每日观察一般行为及体征情况,每两周检测 1 次鼠尾血压,饲养 20 周后行心脏超声检测和血清氨基末端脑钠肽前体(N-Terminal-pro brain natriuretic peptide, NT-proBNP)含量测量,以

评价模型是否建立成功。

### 1.4 粪便样本预处理

模型建立成功后,收集所有大鼠的粪便样本,进行上机前的预处理:(1)60 mg 粪样中添加 20 μL 的 L-2-氯苯丙氨酸(0.3 mg/mL)和 600 μL 的甲醇:水(V:V=4:1);(2)添加两颗钢珠,-20 ℃预冷 2 min,研磨机 60 Hz 条件下研磨 2 min;(3)超声提取 10 min,低温条件下放置 30 min;(4)离心 10 min(12 000 r/min、4 ℃),取 200 μL 上清液,过滤后装瓶,保存于-80 ℃冰箱中,待上机检测用。

### 1.5 UPLC-MS 分析条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm,1.7 μm),柱温 45 ℃;流动相:A-水、B-乙腈,流速 0.4 mL/min,进样量为 5 μL。质谱条件:选用 ESI 离子源,在正、负离子模式下进行信号采集;Capillary voltages 设置:正离子 3 kv,负离子-2 kv。

### 1.6 数据处理

运用 Progenesis QI v2.3 软件处理上机检测后得到的原始数据,主要进行基线过滤、保留时间校正、峰对齐和峰识别。将正、负离子数据合并成一个数据矩阵,矩阵包含了原始数据提取到的所有可以用于后续分析的信息。基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,选用 Human Metabolome Database 数据库和 Metlin 数据库进行化合物的定性定量分析。

### 1.7 统计学分析

运用 SIMCA14.0 软件分析数据矩阵,先进行无监督的主成分分析(PCA),随后进行有监督的偏最小二乘判别分析(PLS-DA),生成得分图。差异代谢物筛选基于正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),以变量权重值 VIP>1.0 视为对分类具有较大贡献的变量,进一步行 *t* 检验和 Log<sub>2</sub>(FC)分析,以 *P*<0.05 且 FC>2.0 为最终纳入条件。运用 MetaboAnalyst 网络软件进行差异代谢物的通路拓扑分析,筛选出与模型相关的显著通路。

## 2 结果

### 2.1 模型评价

自高盐饮食后,模型组大鼠的收缩压一直维持在 140 mmHg 上,饲养 4 周后基本保持在 160 mmHg

以上,符合高血压病的诊断标准,可构成心脏器质性损伤;空白对照组大鼠的收缩压始终未超过140 mmHg,难以构成靶器官心脏的损伤,可作为空白对照。饲养结束后,模型组左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(fraction shortening, FS)显著低于空白对照组( $P < 0.01$ ),NT-proBNP值显著高于空白对照组( $P < 0.01$ ),确定已成慢性心衰模型,见表1。

表1 两组大鼠相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LVEF/%	FS/%	NT-proBNP/(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	6	91.36±6.02	60.64±11.14	193.72±10.10
模型组	7	71.27±6.51**	36.21±7.56**	457.20±27.04**

注:与空白对照组比较,\*\* $P < 0.01$

造模结束后,模型组大鼠均出现心率增快、精神萎靡、呼吸急促、蜷缩喜卧、易激怒等体征及行为表现,较好地表现出心悸、气短、乏力、烦躁等心气阴虚证的证候特点,符合本课题组前期“以方测证”研究的结果,认为已成心气阴虚证动物模型<sup>[1-3]</sup>。

## 2.2 总离子流图

UPLC-MS分析后,获得两组大鼠正负离子模式下的代表性总离子流图(total ion chromatography, TIC),具体见图1。

## 2.3 模式判别分析

PCA可从总体角度反映样本组间和组内的变异度,从PCA得分图中可直观地看出两组样本之间的整体代谢轮廓差异;PLS-DA运用偏最小二乘回

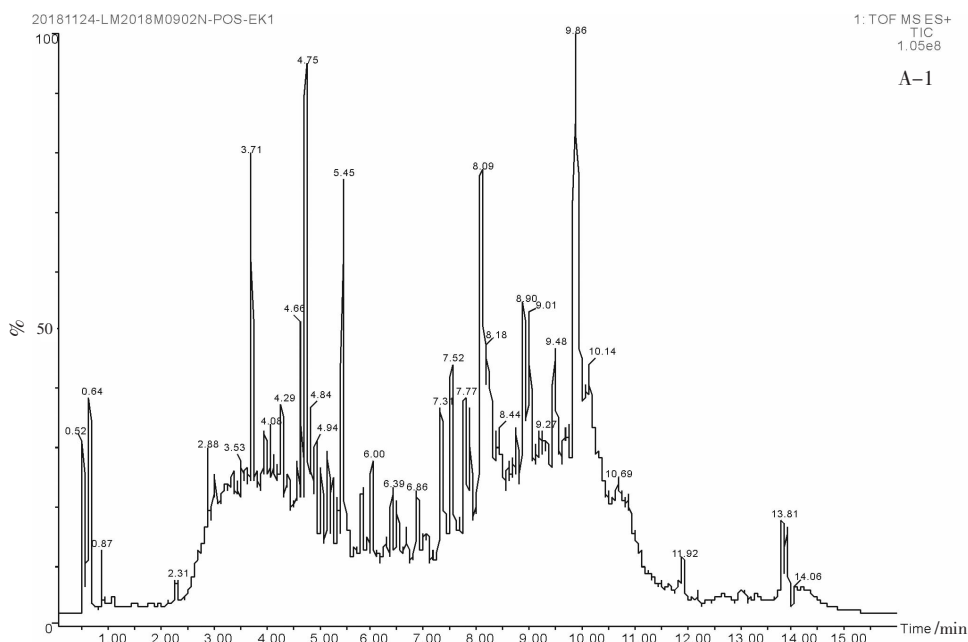
归建立代谢物表达量与样本分组之间的关系模型,以预测样本类别,解释组间差异。从两组大鼠的PCA得分图、PLS-DA得分图(图2)可看出,两组的样本点在分布上完全分开,组内的聚集效果良好,组间的分离趋势显著,预测模型的拟合能力较好。表明慢性心衰心气阴虚证大鼠的代谢功能被明显扰动,与正常大鼠间存在显著的代谢表型差异。

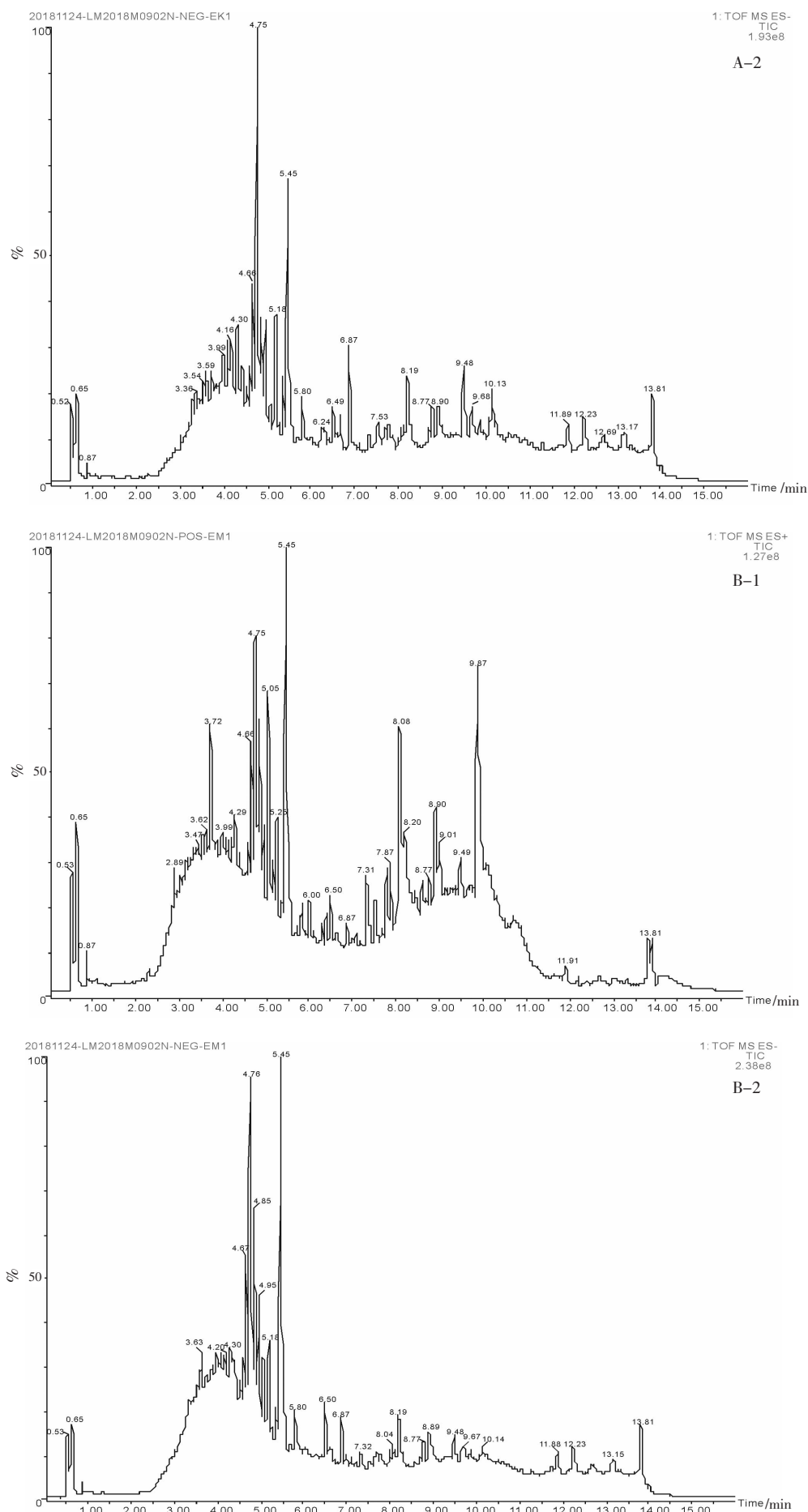
## 2.4 差异代谢物筛选

OPLS-DA模型下的变量权重值(VIP)可以说明某一变量对造成分组的贡献;Log<sub>2</sub>(FC)值说明代谢物在两组样本中平均表达量的比值。本次研究对筛选VIP>1.0的慢性心衰心气阴虚证大鼠代谢物进行t检验及FC分析,以 $P < 0.05$ 且 $FC > 2.0$ 为条件,共挖掘出组间差异代谢物15种,具体见表2。与空白对照组比较,模型组神经氨酸、尿苷、丙氨酰色氨酸、酪氨酰缬氨酸、苯丙氨酰甘氨酸、牛磺脱氧胆酸、粪甾烷酸、白三烯E<sub>4</sub>的水平上调,谷氨酸、酪氨酸、烟酸、鞘氨醇、二十四烷酸、二十二碳六烯酸、亚油酸的水平下调。

## 2.5 代谢路径分析

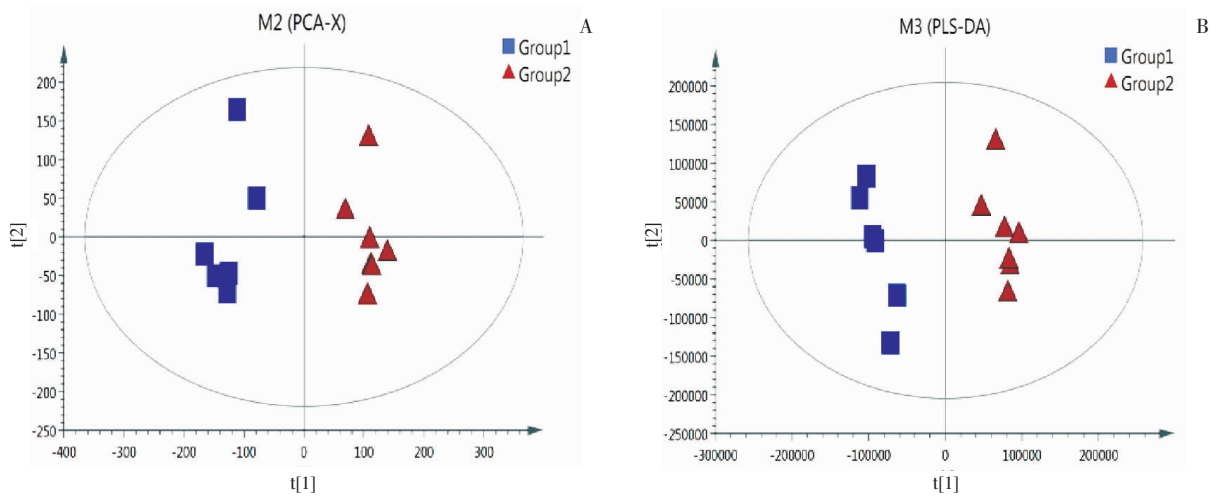
为进一步解读代谢图谱,选用MetaboAnalyst网络软件(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行差异代谢物的路径拓扑分析。分析发现,与模型大鼠相关的15种差异代谢产物共参与19条代谢通路,绘制了通路分析概要图,以全局性的角度观察模型的生物学变化,见图3。其中2条通路富集性较显著,分别为氮代谢通路(nitrogen metabolism)和氨酰tRNA的生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)。





注:A-1.空白对照组正离子模式 TIC;A-2.空白对照组负离子模式 TIC;B-1.模型组正离子模式 TIC;B-2.模型组负离子模式 TIC

图 1 空白对照组和模型组 TIC

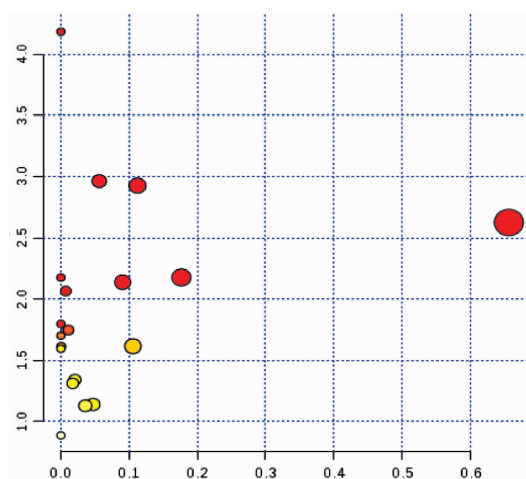


注: Group1 为空白对照组(蓝点), Group2 为模型组(红点); A 为 PCA, B 为 PLS-DA

图2 空白对照组与模型组的 PCA、PLS-DA 得分图

表2 差异代谢物基本信息

代谢物	英文名	质荷比	保留时间/min	离子模式	模型组含量变化
谷氨酸	L-glutamic acid	128.03	0.98	负	下降
酪氨酸	L-tyrosine	180.06	1.06	负	下降
神经氨酸	neuraminic acid	266.08	1.66	负	上升
烟酸	nicotinic acid	124.03	0.87	正	下降
鞘氨醇	sphingosine	300.29	5.20	正	下降
尿苷	uridine	487.13	2.97	负	上升
丙氨酰色氨酸	alanyltryptophan	276.13	2.80	正	上升
酪氨酰缬氨酸	tyrosyl-valine	298.17	2.08	正	上升
苯丙氨酰甘氨酸	phenylalanyl-glycine	267.08	3.30	负	上升
牛磺脱氧胆酸	taurodeoxycholic acid	498.28	4.50	负	上升
粪甾烷酸	coprocholic acid	449.32	5.83	负	上升
二十四烷酸	tetracosanoic acid	407.33	6.86	正	下降
二十二碳六烯酸	docosahexaenoic acid	329.24	7.29	正	下降
亚油酸	linoleic acid	279.23	8.19	负	下降
白三烯 E <sub>4</sub>	leukotriene E <sub>4</sub>	425.25	4.85	负	上升



注: 横坐标是通路影响值, 纵坐标是通路富集分析的  $-\log(P)$  值, 图中每一圆点代表一条代谢通路

图3 代谢通路分析概要图

### 3 讨论

在心衰的病理过程中, 心脏的功能与结构持续受损, 机体供能不足, 这必然会引起体内部分功能的失衡。前期研究以血液代谢产物为切入点, 发现慢性心衰心气阴虚证模型的内源性代谢功能被明显扰动, 存在三大代谢途径(氨基酸、糖类、脂类)紊乱和肝功能损伤<sup>[3]</sup>。粪便代谢物是肠道微生物和宿主共代谢的结果, 许多研究证据表明: 肠道微生物及其代谢产物与心衰间有着广泛关联, 这为开展心衰模型的粪便代谢组学研究提供了依据<sup>[4]</sup>。本研究发现慢性心衰心气阴虚证模型大鼠的粪便代谢轮廓出现变化, 筛选出与该模型相关的 15 种代谢物和 2 条代谢路径, 对上述关键信息进行分析, 以进一步阐明该

病证的微观本质。

在已筛选的差异代谢物中,氨基酸及其合成的多肽类物质占比最重。心衰的病理过程中伴随着心脏产能的底物利用改变,即糖、脂氧化供能向氨基酸供能转化,氨基酸代谢增强以满足机体的能量需求,故可见氨基酸类物质谷氨酸、酪氨酸的水平紊乱。谷氨酸、酪氨酸参与了氨酰 tRNA 的生物合成,氨酰 tRNA 的主要作用为转运氨基酸以促进蛋白质的合成<sup>[6]</sup>。氨基酸和氨酰 tRNA 出现改变,直接影响了蛋白质的合成,同时心衰时的各种损伤因素均可导致蛋白质代谢的异常,主要体现在丙氨酰色氨酸、酪氨酰缬氨酸和苯丙氨酰甘氨酸等蛋白质水解的中间产物呈高水平表达状态。

鞘氨醇属鞘脂类化合物,参与细胞的生长、分化、衰老和程序性死亡等重要的信号转导过程,是细胞膜结构的重要组成部分<sup>[7]</sup>。长期高盐饮食会损伤血管内皮细胞而诱发炎症反应,损伤血管构架与功能,推动高血压病、心衰等心血管疾病的发展进程。炎症反应可扰动细胞膜,影响鞘脂类代谢通路,同时产生白三烯 E<sub>4</sub> 等炎症介质类化合物<sup>[8]</sup>。另有研究表明,氮代谢通路异常可上调部分细胞因子及生物活性物质的表达,与炎症反应关系密切<sup>[9]</sup>。鞘氨醇、白三烯 E<sub>4</sub> 水平紊乱及氮代谢通路异常,验证了炎症反应是该病证模型的病理机制之一。

脂类代谢方面,二十二碳六烯酸和亚油酸均属于多不饱和脂肪酸,二十二碳六烯酸具有促进胆固醇排泄、抑制内源性胆固醇合成的作用;亚油酸能与胆固醇结合,防止胆固醇淤积于血管壁,从而调节体内脂质堆积<sup>[10]</sup>。不饱和脂肪酸在脂质调节方面发挥着重要的作用,其水平紊乱是导致体内脂类代谢障碍的关键原因之一。二十四烷酸是一种长链脂肪酸,多呈游离状态存在,有异于大部分脂肪酸,但目前针对该物质的研究较少,其变化机制有待进一步的研究。

牛磺脱氧胆酸属结合胆汁酸,由游离胆汁酸以酰胺键与牛磺酸相结合而生成;粪甾烷酸属三羟基胆汁酸。前期研究已证实该模型存在胆固醇代谢障碍,胆固醇直接参与胆汁酸的合成,其代谢障碍必然

影响胆汁酸代谢,故可见牛磺脱氧胆酸和粪甾烷酸水平紊乱<sup>[11]</sup>。另一方面,胆汁酸主要存在于肠-肝循环系统中,可在肠道内转运脂肪,调节脂类代谢,从胆汁酸代谢障碍推测出该模型可能存在肠道功能的失衡<sup>[12]</sup>。值得注意的是,本研究发现的二十二碳六烯酸、亚油酸和烟酸等物质,主要来源于肠道对食物的摄取,生物体内的自身生成量甚少,上述物质的水平紊乱也在一定程度上反映了模型的肠道功能失衡。

综合分析慢性心衰心气阴虚证模型大鼠的粪便代谢图谱,发现该病证模型的病理机制涉及氨基酸、蛋白质、脂代谢紊乱和炎症反应、肠道功能失衡等多个层面。本研究进一步揭示了与该病证模型相关的生物学信息,以期为中心衰的诊疗提供新思路,并为今后开展心衰模型的靶向代谢组学和肠道菌群研究提供借鉴。

## 参考文献

- [1] 李欣春,梁 昊,胡志希,等.高血压心力衰竭大鼠动物模型的研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):245-248.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 侯 灿,曹海涛.肠道菌群及其代谢产物与心血管疾病关系的研究进展[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(1):149-152,157.
- [5] 何锴琳,纪浩然,张 航,等.心肠对话:肠道菌群在心血管疾病中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(8):718-723.
- [6] 郑景辉,伍新诚,陈建军,等.冠心病血瘀证患者代谢组学生物信息学分析[J].中华中医药学刊,2017,35(11):2794-2797.
- [7] 周 元,张沐新,张亚楠,等.基于质谱技术的黄芩治疗 2 型糖尿病的粪便代谢组学研究[J].质谱学报,2018,39(6):679-686.
- [8] 潘文慧,蒋海强,李运伦.钩藤提取液对自发性高血压大鼠尿液代谢组学的影响[J].中医杂志,2019,60(1):62-66,71.
- [9] 韦 卓,伍新诚,郑景辉.基于文献计量学的高血压肝阳上亢证病人血浆代谢组学研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(12):1765-1772.
- [10] 简维雄,左和宁,刘 韶,等.基于代谢组学的心血管梗阻动态演变过程研究[J].中国中西医结合杂志,2016,36(12):1496-1503.
- [11] 陈可纯,罗朵生,郭 姣.田黄方治疗高脂血症大鼠粪便代谢组学研究[J].中药药理与临床,2018,34(5):100-104.
- [12] 苏冠宁,孙 赫,吴高峰,等.胆汁酸的肠肝循环及胆汁酸受体在糖脂代谢中的调控作用[J].动物营养学报,2019,31(8):3511-3521.

(本文编辑 杨 瑛)