

荷丹调脂方对小鼠脂质代谢的影响

蔡琳玲¹, 方丽文¹, 刘子修²

(1. 东南大学附属中大医院, 江苏 南京 210009; 2. 中国人民解放军东部战区空军医院药学部, 江苏 南京 210002)

摘要:目的 研究荷丹调脂方对高脂血症小鼠血浆脂质代谢异常的调节作用。方法 通过高效液相-二维线性离子阱高分辨静电场组合质谱仪(UPLC-LTQ/Orbitrap XL)的脂质组学研究方法,考察药物干预对脂质代谢的影响,寻找潜在生物标志物,探讨荷丹调脂方调节脂代谢的作用途径。结果 正常组、模型组、荷丹调脂方组血浆脂质谱明显分离。鉴定了血浆中与荷丹调脂方影响的 11 种生物标志物,主要包括磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)和甘油三酯(TG)。荷丹调脂方干预对部分异常脂质代谢具有明显的改善作用。结论 荷丹调脂方能有效缓解高脂饮食诱导的磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱和甘油三酯代谢紊乱,表明荷丹调脂方调血脂的作用机制可能与调节这些代谢途径有关。

关键词:荷丹调脂方;液质联用;磷脂酰胆碱;溶血磷脂酰胆碱;甘油三酯

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2020)03-0365-05

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0365

引文格式:蔡琳玲,方丽文,刘子修.荷丹调脂方对小鼠脂质代谢的影响[J].南京中医药大学学报,2020,36(3):365-369.

Effect of Hedan Tiaozhi Recipe on Lipid Metabolites in Mice

CAI Lin-ling¹, FANG Li-wen¹, LIU Zi-xiu²

(1. Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, 210009, China; 2. Department of Pharmacy, Air Force Hospital of the Eastern Theater of the People's Liberation Army of China, Nanjing, 210002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the regulatory effect of Hedan Tiaozhi Recipe on abnormal plasma lipid metabolism in hyperlipidemia mice. **METHODS** By using UPLC-LTQ/Orbitrap XL, the effect of drug intervention on lipid metabolizer group was investigated, potential biomarkers were searched, and the action way of Hedan Tiaozhi Recipe in regulating lipid metabolism was explored. **RESULTS** Mass spectrometry of plasma lipids of normal group, model group and Hedan Tiaozhi Recipe group were all significantly separated. 11 biomarkers were identified in the plasma, mainly including phosphatidylcholine, lyso-phosphatidylcholine and triglyceride including phosphatidylcholine. The intervention of Hedan Tiaozhi Recipe significantly improved some abnormal lipid metabolism. **CONCLUSION** Hedan Tiaozhi Recipe can effectively alleviate the metabolism disorder of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and triglyceride induced by high-fat diet, which indicated that the mechanism of Hedan capsule regulating blood lipid may be related to the regulation of these metabolic pathways.

KEYWORDS: Hedan capsule; HPLC-MS; phosphatidylcholine; lysophosphatidylcholine; triglyceride

高脂血症是一种以血脂异常为主要特征的代谢综合征,是动脉粥样硬化、冠心病、脂肪肝的诱发因素之一^[1]。临床上运用他汀类药物治疗高脂血症,虽然能够显著降低血浆中的总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c),升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c),降低心脑血管疾病的发病率,但他汀类药物能够引起胃肠道反应、肝损伤以及横纹肌溶解症等毒副反应^[2]。荷丹调脂方是由

荷叶、丹参、补骨脂、山楂及番泻叶组成的复方中成药,荷叶行气祛湿、丹参活血化瘀、山楂理气消食、番泻叶润肠通便、补骨脂温补肝肾,具有活血化瘀、补肝益肾、化痰降浊等功效,进而降低血脂,同时临床运用鲜有不良反应的报道。国内很多基础及临床实验中已经证实荷丹调脂方具有降脂、减体质量和改善胰岛素抵抗的作用。本研究通过液质联用及数学建模的方式筛选出荷丹调脂方能够显著调节的脂质

收稿日期: 2019-11-19

基金项目: 军区医学科技创新项目(15MS074)

第一作者: 蔡琳玲,女,中药师,E-mail:cailinling2003@163.com

通信作者: 刘子修,男,主管中药师,主要从事临床药学及药物制剂,E-mail:liuzixiu3221@126.com

种类,丰富临床用药的依据。

1 材料

1.1 药物

荷丹调脂方主要由荷叶、山楂、丹参、补骨脂(盐炒)、番泻叶。购自南京鹤龄有限公司,由周惠英主管药师鉴定为合格正品。

1.2 血清样本

由南京中医药大学提供,包括:正常饮食饲喂 4 周大鼠血清 50 μL 、高脂饮食饲喂 4 周大鼠血清 50 μL 、荷丹调脂方灌胃给药(600 mg/kg)+高脂饮食饲喂 4 周大鼠血清 50 μL 。

1.3 试剂

HPLC 级甲醇、乙腈、异丙醇、甲基叔丁基醚(Merck,德国),HPLC 级甲酸、甲酸铵(ROE,美国)。

1.4 仪器

LTQ/OrbitrapXL 质谱仪、UltiMate 3000 型超高效液相色谱,Millipore Synergy 型超纯水系统(Merck,德国),KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的小鼠血清于 4 $^{\circ}\text{C}$ 解冻,精密吸取 20 μL 血清于 1.5 mL 离心管中,加入 225 μL 含内标[Lyso PE(17:1),SM(17:0),PE(17:0/17:0)浓度约为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]的冰甲醇,涡旋 10 s,加入 750 μL MTBE 再次涡旋 10 s,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 10 min,加入 188 μL 超纯水,涡旋 20 s 后于 4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 r/min 离心 2 min,吸取 350 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中,置于离心浓缩仪中挥干。挥干的样品用 110 μL 复溶液(甲醇:甲苯=9:1)进行复溶,即涡旋 10 min,超声 10 min,14 000 r/min 离心 10 min 后取上清进样分析^[3]。

3 脂质组学及分析

3.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil GOLD aQ 柱(Thermo Fisher,2.1 mm $\times$ 150 mm,3 μm)。流动相:A 为含 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵的乙腈/水溶液(40:60,V/V),B 为含 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵的异丙醇,乙腈溶液(9:1,V/V)。梯度洗脱程序:0~1 min,20% B;1~21 min,20%~100% B;21~25 min,100% B;25~30 min,20% B。流速:0.35 mL/min;柱温:55 $^{\circ}\text{C}$;自动进样器温度:4 $^{\circ}\text{C}$;进样量 2 μL ^[4]。

3.2 质谱条件

仪器使用 Thermo LTQ Orbitrap XL,电喷雾离子源(ESI),正负离子电离模式,正离子喷雾电压为 4.80 kV,负离子喷雾电压为 4.50 kV,鞘气 40 arb,辅助气 15 arb。毛细管温度 325 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 35 V/-15 V,管透镜电压 50 V/-50 V,以分辨率 60 000 进行全扫描,扫描范围 50~1 000,并采用 CID 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除(重复计数为 2)去除无必要的 MS/MS^[5]。

3.3 质量控制

在进行基于质谱技术的代谢组学研究时,为了获得可靠且高质量的代谢组学数据,通常需进行质量控制(QC)与质量保证(QA)工作。通过 QC,可以获取整个实验的系统误差是否在可控范围内;通过 QA,剔除不可靠的变量,可以将分析误差控制在不影响多变量统计分析结果的范围内。若 QC 的误差在 2 SD 以内,则 QC 样本聚集系统可靠。对于 QA,FDA 建议用于生物标记物分析的 RSD 小于 30%是可以接受的,因此对 RSD 大于 30%的变量在后续生物标记物发现过程中进行剔除,由此将 QA 的 RSD 控制在 30%以内^[6]。

4 数据分析

4.1 主成分分析(PCA)

PCA 是一种运用线性代数的数据降维方法,为无监督分析方法,能够反映数据的原始状态。PCA 将代谢物变量按一定的权重通过线性组合后产生新的特征变量,通过主要新变量(主成分)对各组数据进行归类,因无外加人为因素,得到的 PCA 模型反映了代谢组数据的原始状态,有利于掌握数据的整体情况并对数据从整体上进行把握,有利于发现和剔除异常样品,提高模型的准确性。

4.2 主坐标分析(PCoA)

PCoA 是一种线性代数的处理方式,该模型能够展示样本间相似性,它的分析思路与 PCA 分析基本一致,都是通过降维方式寻找复杂样本中的主要样本差异距离。与 PCA 不同的是,PCoA 主要利用 Unifrac、Bray-Curtis 等样本距离信息进行计算以及降维图形展示,因此结果更集中于体现样本间的相异性距离。

4.3 非度量多维尺度分析(NMDS)

NMDS 是一种将多维空间的研究对象(样本或变量)简化到低维空间进行定位、分析和归类,同时又保留对象间原始关系的非线性数据分析方法。

NMDS 模型适用于无法获得研究对象间精确的相似性或相异性数据,其设计目的是为了克服线性模型(包括 PCA、PCoA)的缺点,更好地反映生态学数据的非线性结构。

4.4 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

OPLS-DA 是一种有监督的判别分析,首先使用正交信号校正技术,将自变量 X 矩阵信息分解成与因变量 Y 相关和不相关的两类信息,然后将与 Y 相关的信息集中在第一个主成分方向,不相关信息放在其他主成分方向。 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2Y 分别表示 OPLS-DA 模型自变量的可解释方差和百分比、模型因变量的可解释方差和百分比及模型的可预测度。

4.5 差异代谢物筛选条件选择

代谢组学差异代谢物筛选可结合采用单变量分析和多元数据分析或选择其中一种。用于筛选差异代谢物的单变量数据分析,包括 2 组间比较的 t 检验(t test)和差异倍数分析(FC),多组件比较的方差分析(ANOVA);多元数据分析为偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和 OPLS-DA。相关差异代谢物筛选条件有:

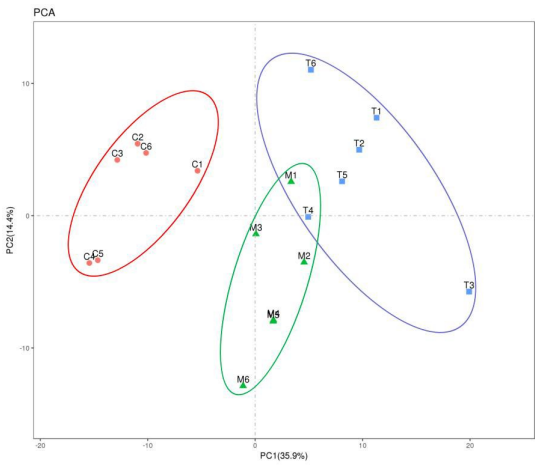
- ① $P\text{-value} \leq 0.05 + VIP \geq 1$; (t test, PLS-DA/OPLS-DA)
- ② $P\text{-value} \leq 0.05 + \text{fold_change} \geq 1.5$ 或 ≤ 0.667 ; (t test, FC)
- ③ $P\text{-value} \leq 0.05 + VIP \geq 1 + \text{s-plot. pcorr} \geq 0.8$; (t test, FC, PLS-DA/OPLS-DA)
- ④ one-way ANOVA $P\text{-value} \leq 0.05$; (one-way ANOVA)
- ⑤ two-way ANOVA $P\text{-value} \leq 0.05$. (two-way ANOVA)

本次研究采用条件②筛选差异脂质代谢物。

5 结果

5.1 PCA 分析结果

采用对照组(C)、模型组(M)以及荷丹调脂方组(T)3 组样品建立 PCA 模型,模型第一主成分(PC1)解释了代谢组方差和的 35.9%,第二主成分(PC2)解释了方差和的 14.4%,模型质量较好。以第一和第二主成分绘制 3 组样品的 PCA 得分图(图 1),由图可知,对照组(C)、模型组(M)以及荷丹调脂方组(T)组间存在分组趋势,无异常样本。

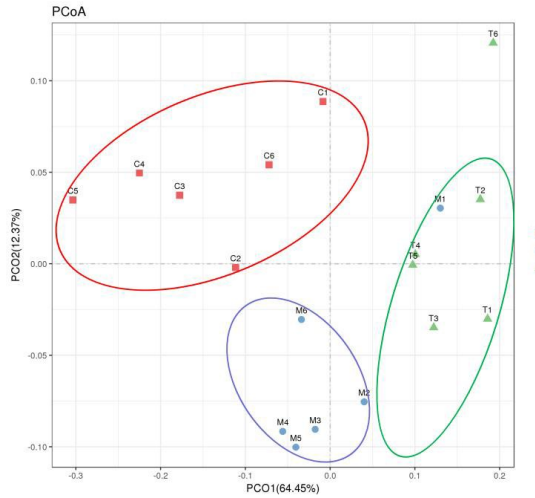


注: C. 对照组; M. 模型组; T. 荷丹调脂方组

图 1 不同组别 PCA 主成分分析图

5.2 PCoA 分析结果

由 PCoA 图(图 2)可知对照组(C)、模型组(M)以及荷丹调脂方组(T)样品按照分组分别聚集为 3 组,显示了各组间样本的差异较大;PCoA 模型中第一主成分(PCo1)解释的自变量差异为 64.5%,模型第二主成分(PCo2)解释的自变量差异为 12.4%。

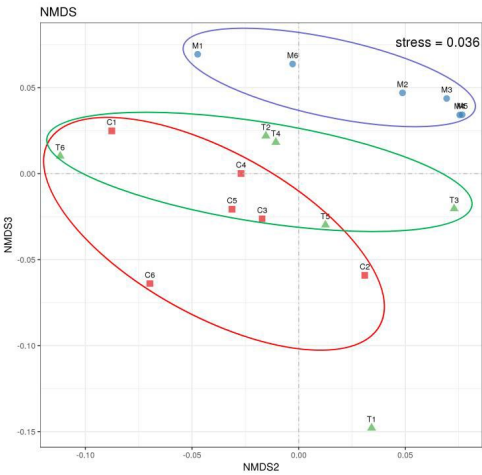


注: C. 对照组; M. 模型组; T. 荷丹调脂方组

图 2 不同组别 PCoA 主坐标分析图

5.3 NMDS 分析结果

由图 3 可知,对照组(C)和模型组(M)样本分开,显示了 2 组间样本差异较大;荷丹调脂方组(T)和模型组(M)样本分开,显示了 2 组间样本差异较大;对照组(C)和荷丹调脂方组(T)存在交集,2 组样本不能明显分开,显示了组间样本的相似性。模型应力 stress 一般在 0.2 以内则可接受,本次建模 stress=0.035,显示了极佳的拟合效果。



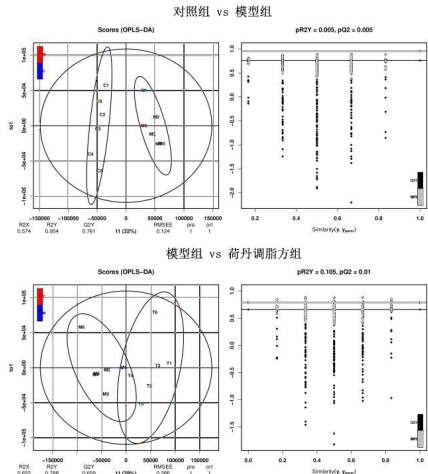
注:C. 对照组;M. 模型组;T. 荷兰调脂方组

图 3 不同组别 NMDS 分析图

5.4 OPLS-DA 分析结果

OPLS-DA 模型用于进一步分析 3 组样品间差异的显著性。由得分图可知,对照组与模型组以及模型组与荷兰调脂方组两两组间的模型解释的代谢组差异分别为 32%和 39%,解释的分组信息差异分别为 95.4%和 78.8%,对分组信息的预测性为 0.761 和 0.659,数学建模较为合理。得分图中两两组间样本存在分离趋势,显示了两两组间代谢物的差异性。为了进一步分析组间差异的显著性,使用排列交叉验证(Permutation test)来评估 OPLS-DA 模型是否过度拟合(Overfitting)。随机模型质量用 R^2Y 和 Q^2 表示,由图可知对照组与模型组随机模型 R^2Y 和 Q^2 的经验性 P 值分别为 0.005 和 0.005,未出现过度拟合情况,2 组样品差异显著;荷兰调脂方组与模型组间随机模型 R^2Y 和 Q^2 的经验性 P 值分别为 0.105 和 0.01,也未出现过度拟合情况,2 组间差异也达到了显著水平。因而,本实验建立的 OPLS-DA 模型具有较高的可靠性,建模方式

成功,荷兰调脂方对小鼠血浆脂质代谢网络产生了较大影响。OPLS-DA 得分图以及排列交叉验证结果见图 4。



注:C. 对照组;M. 模型组;T. 荷兰调脂方组

图 4 不同组别 OPLS-DA 得分图(左)与排列交叉验证图(右)

5.5 差异脂质代谢物筛选结果

差异代谢物的相对含量及名称、统计学参数分别见表 1~2。

表 1 筛选出的由药物调节的差异脂质代谢物

名称	对照组	模型组	治疗组
LysoPC 20 : 2	2.49E+08	4.73E+07	1.57E+08
LysoPC 23 : 0	3.05E+08	1.92E+08	2.75E+08
PC 34 : 1	1.28E+08	1.28E+07	5.13E+07
PC 36 : 2	2.39E+07	1.28E+08	2.06E+08
PC 36 : 4	1.15E+08	6.36E+07	1.04E+07
PC 38 : 1	3.89E+08	1.11E+08	3.57E+08
TG 50 : 3	1.13E+08	4.69E+08	4.05E+08
TG 52 : 4	8.79E+07	7.83E+08	2.33E+08
TG 54 : 5	1.61E+08	3.87E+08	2.38E+08
TG 54 : 6	1.09E+08	3.22E+08	1.99E+08
TG 56 : 5	1.49E+07	1.44E+08	9.49E+07

表 2 差异脂质代谢物的统计学参数

名称	log2_FC(C/M)	C vs M P -value	log2_FC(M/T)	M vs T P -value
LysoPC 20 : 2	2.397 2	<0.000 1	-1.728 5	0.024 5
LysoPC 23 : 0	0.669 4	<0.000 1	-0.524 0	0.023 4
PC 34 : 1	3.327 2	0.000 1	-2.004 5	0.005 2
PC 36 : 2	-2.420 4	<0.000 1	-0.689 4	0.014 1
PC 36 : 4	0.852 2	<0.000 1	2.610 8	0.001 2
PC 38 : 1	1.815 6	0.001 5	-1.693 1	0.012 7
TG 50 : 3	-2.054 5	0.000 9	0.212 7	0.019 0
TG 52 : 4	1.406 6	0.004 8	-3.154 6	0.015 8
TG 56 : 5	-1.268 3	0.000 3	0.704 8	0.008 5
TG 54 : 6	-1.564 3	0.006 1	0.693 6	0.003 5
TG 56 : 5	-3.273 8	<0.000 1	0.605 4	0.046 4

5.6 差异代谢物统计结果

荷丹调脂方能够显著降低模型组甘油三酯(TG),包括 TG 50 : 3、TG 52 : 4、TG 54 : 5、TG 54 : 6、TG 56 : 5 在血浆中的含量;荷丹调脂方能够显著升高模型组磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)包括:LysoPC 20 : 2、LysoPC 23 : 0、PC 34 : 1、PC 36 : 2、PC 36 : 4、PC 38 : 1 在血浆中的含量。组间差异代谢物量化图见图 5。

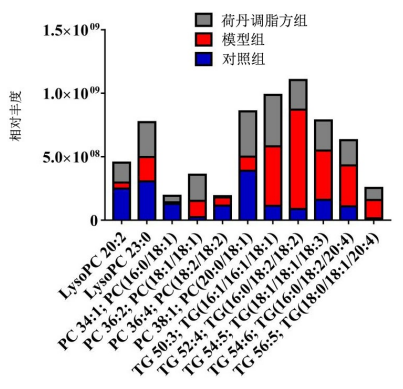


图 5 差异脂质代谢物的箱式柱状图

6 讨论

血脂异常是心脑血管疾病中极为重要的致病危险因素,减少外源性脂质的摄入、降低内源性脂质的合成及增加机体脂质代谢能力是目前调控血脂的重要思路。血液中的脂质主要以脂蛋白的形式在血浆中转运,共同维持机体血脂的稳态,脂蛋白的组成主要包括甘油三酯类、胆固醇酯(CE)类、磷脂类以及相应的载脂蛋白。PC 是目前公认的最具有生物学活性的磷脂,被广泛地运用在生物医药领域^[7]。血浆中的脂质多以载脂蛋白嵌入磷脂包裹的脂质核心的脂蛋白颗粒形式在血浆中运输,其中 PC 起到亲和极性载脂蛋白与非极性脂质的作用。PC 在卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)催化下能够转化为 LysoPC,同时生成一分子游离脂肪酸(FFA),FFA 再同外周组织、巨噬细胞等转移出的游离胆固醇一起形成 CE,减少了胆固醇在外周组织、巨噬细胞的沉积,从而降低动脉粥样硬化的发病风险^[8]。因此,较高水平的 PC、LysoPC 反映了血浆脂质的转运能力。TG 是一种可供外周组织利用的供能物质,对于其是否直接增加心脑血管突然事件的发生率尚存在争议,但临床调查显示血浆中过高的 TG 含量是诱发心脑血管疾病突发事件的独立风险因素^[9]。

对荷丹调脂方的药理学研究已经证实了其能够

升高 LCAT,加速脂质的逆向转运,减少脂质在血管壁的沉积,降低血液黏稠度,保护血管内皮的完整性,同时还能降低血浆炎症因子水平,发挥抗心脑血管疾病的作用^[10]。通过 UPLC-MS 以及多种数学建模分析(PCA、PCoA、NMDS、OPLS-DA)验证了荷丹调脂方对高脂饮食小鼠血浆脂质的调节和改善作用,荷丹调脂方通过升高能够促进血浆脂质转运的 6 种 PC、LysoPC 含量,促进外周游离胆固醇的酯化,被载脂蛋白携带最终转运回肝脏代谢,从而降低了血浆胆固醇的含量;同时给予荷丹调脂方能够显著降低血浆中由于造模而升高的 5 种 TG,从而部分降低血液的黏稠度,降低对血管壁的机械性损伤。由于方法学的限制,我们在分析中没有得到完整的胆固醇类组分,但对检测出的几种 CE 的量化统计显示了荷丹调脂方降低了模型组显著升高的血浆胆固醇,这样的结果与临床报道一致。总之,我们的研究结果证实了荷丹调脂方的降脂作用,丰富了其临床用药的依据,同时筛选出了药物显著性调控的脂代谢产物,为进一步阐明荷丹调脂方参与调控的脂代谢靶点和相关通路提供了思路。

参考文献:

[1] REINER E. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14: 401-411.

[2] 杨永革,王占庆,姜楠,等. 他汀类药物的不良反应[J]. 医药导报, 2011, 30(6): 817-820.

[3] 吴娜琼,徐瑞霞,李莎,等. 荷丹片对高脂血症患者血脂谱、PC-SK9 水平及高密度脂蛋白颗粒的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(12): 1277-1280.

[4] 张淑丽,王怡萍,杜振霞,等. 基于 UPLC-/TOF-MS 技术的果糖诱导高尿酸血症大鼠血清脂质代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1135-1139.

[5] 杜丽娜,单进军,谢彤,等. 基于液相质谱联用的黄芩水提液抗病毒效应的脂质组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1728-1733.

[6] 成玉,刘玉敏,黄凤杰,等. 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间高分辨质谱的高通量血清代谢组学方法[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(1): 77-83.

[7] 曹栋,裴爱泳,王兴国. 磷脂及磷脂酰胆碱生物学功能[J]. 粮食与油脂, 2002, (11): 23-24.

[8] POLONCOVA K, GRIAC P. Phospholipid transport and remodeling in health and disease [J]. Gen Physiol Biophys, 2011, 30(5): 25-35.

[9] 中国胆固醇教育计划委员会. 高甘油三酯血症及其心血管风险管理专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(2): 108.

[10] XU R, WU N, SHA L, et al. Effects of Hedon Tablet on lipid profile, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and high-density lipoprotein subfractions in patients with hyperlipidemia: A primary study [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(9): 1-6.

(编辑:董宇)