

吴佳芸,李玲玲,乔佳君,等. 持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 428-439.

Wu JY, Li LL, Qiao JJ, et al. A serum metabolomics-based study on persistent hypertensive SHR [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 428-439.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.04.002

持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究

吴佳芸¹,李玲玲¹,乔佳君¹,朱春临¹,李瑞菡¹,景瑞青¹,黄力^{2*}

(1. 北京中医药大学,北京 100029; 2. 中日友好医院,北京 100029)

【摘要】 目的 探讨持续高血压状态自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHR)血清代谢物改变及可能相关的机制。**方法** 随机各取6只雄性SHR和魏-凯二氏大鼠(Wistar-Kyoto rats,WKY)大鼠分别设为模型组和对照组,标准饲养120 d,每周使用BP2000检测收缩压(systolic blood pressure,SBP)。取材后对其心肌组织行HE和Masson染色;采用超高效液相色谱质谱联用(ultra-high performance liquid mass spectrometry and tandem mass spectrometry,UPLC-MS)法检测血清差异性代谢物,并进一步对其进行GO与KEGG富集分析。**结果** 模型组SBP呈逐步升高,约于20周龄达高峰后又趋于稳定,且在各时间点均明显高于对照组($P < 0.001$);伊红-苏木素(hematoxylin-eosin,HE)染色心肌组织排列紊乱,血管壁增厚,管腔缩小,肌间和管腔周围均出现均质粉染物质;Masson染色心肌组织可见大量胶原纤维沉积。血清代谢模式和个体差异代谢物两组间呈现明显分离趋势,共鉴定出44个潜在标志性代谢物,主要涉及神经活性受体配体相互作用、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)突触传导通路、花生四烯酸(arachidonic acid,AA)代谢等代谢途径。**结论** 持续高血压状态SHR存在明显的心肌和血管周围纤维化,其代谢模式明显偏离正常大鼠,血清标志性差异代谢物主要与调节交感神经活性与血管舒缩及抑炎有关。

【关键词】 自发性高血压大鼠;血清差异代谢物;代谢组学;UPLC-MS;信号传导代谢通路
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)04-0428-12

A serum metabolomics-based study on persistent hypertensive SHR

WU Jiayun¹, LI Lingling¹, QIAO Jiajun¹, ZHU Chunlin¹, LI Ruihan¹, JING Ruiqing¹, HUANG Li^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. 2. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)
Corresponding author: HUANG Li. E-mail:lihstrong@163.com

【Abstract】 Objective To investigate metabolomic changes in the serum of rats with persistent hypertensive SHR and reveal the possible pathogenesis. **Methods** Six male SHR and six WKY rats were selected at random and defined as the model group and the control group. Rats were given 120 d standard feeding and rat SBP was measured using the BP2000 platform once a week. Rat myocardial tissue was stained with HE and Masson staining and rat serum was detected by UPLC-MS to identify significant metabolites. In addition, a GO and KEGG pathway enrichment analysis was performed. **Results** The SBP of the model group gradually increased and peaked at aged 20 weeks, which was followed by a plateau period. The SBP of SHR at all time points was much higher than that of the control group ($P < 0.001$). HE staining showed that the myocardial tissue of the model group was in a disordered arrangement, and the vessel walls were thicker, while their lumen

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774105)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81774105).
[作者简介] 吴佳芸(1993—),女,在读博士研究生,研究方向:心血管。Email:nggaiwen@163.com
[通信作者] 黄力(1958—),女,主任医师,博士生导师,研究方向:中西医结合心血管,高血压、冠心病、心衰等。Email:lihstrong@163.com

was narrower. Homogeneous, pink-colored substances were largely found in both the myocardium and around the lumen. Masson staining revealed a very large amount of collagen fiber accumulated in the myocardium of the model group. The serum metabolic patterns and individual differential metabolites of the two groups were evidently separated from each other, and a total of 44 potential landmark metabolites were finally identified, mainly involving neuroactive ligand-receptor interactions, 5-hydroxytryptamine receptors, and arachidonic acid metabolism pathways. **Conclusions** Myocardial and perivascular fibrosis were identified in SHR under long-term hypertension. Serum metabolomics of SHR obviously deviated from the normal metabolic pattern, and significant metabolites were primarily involved in regulating vasoconstriction and vasodilation, modulating the activity of the sympathetic nerve, and inhibiting the inflammatory response.

[Keywords] spontaneously hypertensive rats; serum metabolite differences; metabolomics; UPLC-MS; signaling and metabolism pathways

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高血压病是多基因与多因素共同作用、影响机体正常代谢的异质性疾病。据预计,到 2025 年,全球高血压患者人数将增至 15.6 亿^[1]。高血压是导致心血管病、慢性肾病、糖尿病等疾病的重要危险因素。2010 年,高血压导致的人口死亡已超过全球人口总死亡的 40%^[2]。高血压俨然已位列危及人类健康的疾病榜首,深入剖析其发病机理以便于寻找有效控压、阻止其进展的关键法门是亟待解决的重要问题。近些年来,尽管学者们对高血压发病的原因展开了大量的研究,但具体的发生和发展机制尚未完全明确。代谢组学是通过高通量分析手段如¹H 核磁共振、液相色谱质谱等研究机体体内代谢特征的一种系统方法。与其他组学方法不同,代谢组学中代谢物及其浓度能全面表征分子表型,直接反映疾病状态、细胞或组织的状态与生化活性或对所施加刺激或干扰作出的反应^[3-4]。因此,其有望成为发现与高血压发病相关的代谢物表型及进一步挖掘其分子发病机制的有效方法。自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)是高血压研究中使用最广泛、病理生理过程最接近于人类发病的动物模型,通过对比其与血压正常的魏-凯二氏大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)可以识别出与高血压病有关的变化^[5]。

然而,目前以 SHR 为对象的代谢组学研究观察时间大多为 4 周左右且多以比较药物干预效果的研究为主^[6-9],缺乏对于长期高血压状态下 SHR 血清代谢组变化及特点的探索和研究。事实上,临床中长期处于高血压状态(血压未控制或控制不达标)的患者常占据多数^[10],且由于早期无症状,多数患者往往无法及时确诊。而碍于伦理及诸多客观因素限制,观察持续高血压状态对人体血清代谢组学的改变与特点存在一定难度,因此本研究拟利用

SHR 模型,通过超高效液相色谱-质谱联用(ultra-high performance liquid mass spectrometry and tandem mass spectrometry, UPLC-MS)的方法探究长期高血压状态下血清代谢物变化,从小分子代谢层面阐释持续血压升高对 SHR 的影响,寻找高血压病的潜在生物标志物,挖掘高血压致病的作用点,为临床诊断和治疗高血压提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

随机获取 SPF 级 8 周龄雄性 SHR 和同周龄雄性 WKY 大鼠各 6 只,SHR 体重约 180 ~ 200 g,设为模型组,WKY 大鼠体重约 185 ~ 205 g,设为对照组。所有大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。以标准饲料将所全部大鼠分笼饲养于中日友好医院临研所动物实验中心 SPF 级实验室【SYXK(京)2016-0043】,每笼 3 只,环境适宜,温度在(25 ± 3)℃左右,湿度波动于 45% ~ 55%之间,通风良好,光照时间 12 h 按时交替,无异常噪音刺激,可自由获取水和食物。动物饲养全程均严格按照中日友好医院伦理委员会要求(审批号:No.180209)。

1.1.2 主要试剂与仪器

冷冻生理盐水(0.9% NaCl);4%甲醛溶液;伊红-苏木素(hematoxylin-eosin, HE)染料;Masson 三色染色液;标准品(色谱纯,昆明 BioBioPha 公司/德国 Sigma-Aldrich 公司);甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司,货号 I1014107923);乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司,货号 JB0886630)。

BP 2000 小动物无创血压分析系统(美国 Visitech Systems 公司);石蜡切片机(日本 SAKURA

公司);台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);正置光学显微镜(日本 Olympus 公司);QTRAP 6500+三重四级杆质谱(美国 SCIEX 公司);超高效液相色谱(日本 SHIMADZU 公司);色谱柱(美国 Waters 公司)。

1.2 方法

1.2.1 一般特征

各组大鼠毛发颜色、营养和精神状态、体重、进食饮水、打斗以及大便情况。

1.2.2 血压

在大鼠清醒、环境安静的前提下,每周于同一时间、同一通道将其置于 39℃ 鼠 BP2000 平台固定器中,放置约 10 min(使大鼠适应、尾动脉充分扩张),再测量其尾动脉 SBP。取第 0、30、60、90、120 天的血压结果用于分析,其中每个时间点每组大鼠连续检测 20 组收缩压(systolic blood pressure, SBP)值,最终选取波形更理想的 6 组数据的均值作为计算值。

1.2.3 HE 染色和 Masson 染色

3%戊巴比妥(1 mL/kg)腹腔注射使大鼠麻醉,腹主动脉采血后用 10 mL 注射器抽取冷冻生理盐水于左心房注入,灌注至主动脉管腔接近呈于蛋白透明,迅速解离心脏,用冰盐水再次清洗,其后垂直于心脏左室中轴约上中 1/3 处切取横断组织约 1 cm,放入 4%甲醛溶液中,固定 24 ~ 72 h 后进行脱水、石蜡包埋、切片(3 mm),完成 HE 染色和 Masson 染色,封片后镜下观察。

1.2.4 血清采集及代谢组学检测

禁食 24 h,3%戊巴比妥(1 mL/kg)腹腔注射麻醉后经腹主动脉采血,室温静置 2 h,3000 r/min 离心 10 min 后取上清液,分装后冻于 -80℃。取出时先置于冰上解冻并混匀。取 50 μ L 样本并按照 1:3 比例加入预冷的冰甲醇(含内标)。涡旋 3 min,12 000 r/min、4℃ 离心 10 min 后取上清液,同样条件再离心 5 min,得到上清液用于分析。

液相条件:HSS T3 C18 1.8 μ m(2.1 mm $\times$ 100 mm)色谱柱;柱温 40℃;流速 0.4 mL/min;进样量 2 μ L 样。流动相 A 为水(0.04% 乙酸);B 为乙腈(0.04% 乙酸);洗脱顺序为 0 min,95:5 V/V;11 min,5:95 V/V;12 min,5:95 V/V;12.1 min,95:5 V/V 和 14 min,95:5 V/V。同时为保证检测的稳定性和可重复性,每 10 个检测分析样本中插入

1 个由所有样本提取液混合而成的质控样本。质谱条件:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)温度为 500℃,离子源检测分为正负离子模式,离子喷雾电压分别为 + 5.5 kV 和 - 4.5 kV,离子源气体 I 设为 55 psi,气体 II 为 60 psi,气帘气为 25.0 psi。另,设置碰撞诱导电离参数为高。

1.3 统计学分析

数据经预处理后使用 R 包(www.r-project.org)完成主成分分析(principle component analysis, PCA)、聚类热图、Pearson 相关性热图等,并利用 MetaboAnalyst R 完成正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)。在变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) > 1 的筛选标准基础上用 SPSS 22 对上述差异性代谢标志物进行单变量统计分析,最终取 VIP > 1 且 $P < 0.05$ 的代谢物作为标志性差异代谢物。通过迈维代谢数据库(Metware database, MWDB)数据库和京东基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)(<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库对其进行注释和通路富集分析。统计分析时,符合正态分布的计量资料平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组比较采用 t 检验,非正态计量资料采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

模型组大鼠体重与对照组相比,饲养 120 d 后体重增加较少,两组大鼠体重存在显著差异($P < 0.05$)(见图 1);模型组大鼠毛发偏黄、粗糙欠光泽,精神较对照组亢奋,反应迅速,对光、声音等刺激敏感,情绪较为急躁,经常打斗,部分皮肤可见抓痕或血痂且有咬人倾向,进食多而饮水较少,大便成形且偏硬;对照组大鼠毛发较白且有光泽、精神平和、反应适中、情绪温和稳定、打斗较少、饮水进食均适中、大便较正常。

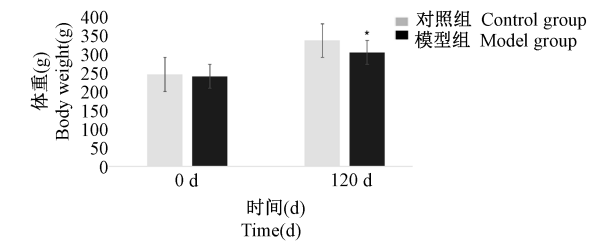
2.2 不同时间点两组大鼠 SBP 比较

模型组大鼠 SBP 在第 0、30、60、90、120 天 5 个时间点均高于对照组($P < 0.001$),差异具有显著性(见表 1)。8 ~ 12 周龄期间,对照组与模型组大鼠 SBP 均呈逐步升高趋势;对照组大鼠自 12 周龄开始 SBP 即趋于稳定,至 24 周龄 SBP 变化很小;而模型组大鼠 SBP 则在经历 12 ~ 16 周龄的短暂稳定期

后,于 20 周龄时再次达到新高峰,后又趋于新的稳定。

2.3 血管 HE 染色与心肌组织 Masson 染色结果

与对照组相比,模型组大鼠 HE 染色结果可见心肌组织排列紊乱,部分已失去正常形态,肌间散布均质粉染物质,提示心肌出现纤维化;肌间血管管壁增厚,管腔变窄,管腔周围可见均质粉染物质,提示血管周围存在纤维化;同时,心肌组织 Masson



注:与对照组比, * $P < 0.05$ 。

图 1 饲养 120 d 前后两组大鼠体重比较

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Comparison of rats weight before and after 120 d standard feeding

染色结果显示:模型组心肌组织较对照组而言,出现广泛而大量的胶原纤维沉积(呈蓝色)(见图 2)。

2.4 血清 UPLC-MS 代谢轮廓谱

如图 3 所示,正负离子模式下代谢轮廓谱比较,负离子模式下对照组和模型组之间差异较为明显,而总离子流图(total ions chromatography, TIC)也有较大区别,这提示两组大鼠血清的代谢模式和代谢产物之间存在差异。

2.5 血清代谢物多元统计分析结果

三维 PCA 结果显示,两组大鼠血清代谢谱之间存在显著差异(见图 4)。OPLS-DA 得分图结果更提示,模型组与对照组两者的代谢模式也有明显分离;而在 OPLS-DA S-plot 图中,横坐标表示主成分与代谢物的协相关系数,纵坐标表示主成分与代谢物的相关系数,越靠近右上角和左下角的代谢物表示其差异越显著,红色的点表明这些代谢物的 VIP 值 ≥ 1 ,绿色的点表示这些代谢物的 VIP 值 < 1 ,其中 VIP 值 ≥ 1 且远离坐标轴原点的点为优先考虑的潜在生物标志物(见图 5A,5B)。

表 1 各组大鼠各不同时间点 SBP 比较($\bar{x} \pm s$, mmHg)
Table 1 SBP of rats in each group at different time periods($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别 Groups	0 d	30 d	60 d	90 d	120 d
对照组 Control group	166.33 ± 5.47	181.00 ± 13.08	179.67 ± 12.47	179.83 ± 6.31	178.67 ± 6.86
模型组 Model group	212.33 ± 10.65 ***	220.50 ± 6.25 ***	221.83 ± 10.96 ***	229.33 ± 6.74 ***	230.17 ± 7.86 ***
P 值 P value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

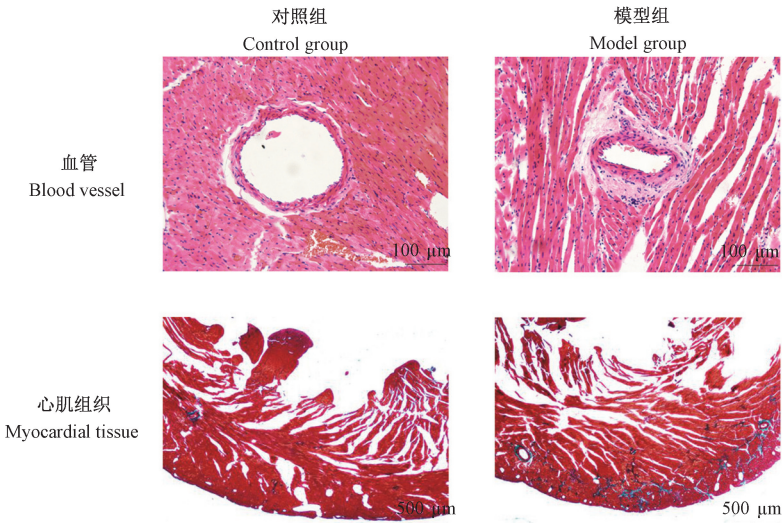


图 2 血管、心肌组织病理染色结果

Figure 2 Pathological staining results of vessels and myocardium

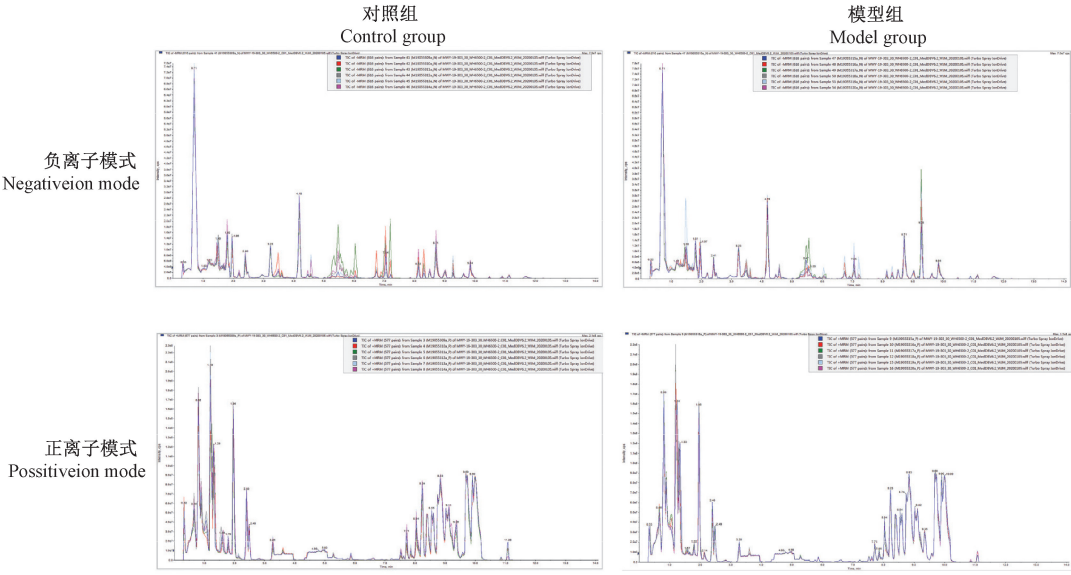


图 3 正负离子模式下对照组、模型组大鼠血清 TIC 图

Figure 3 Serum TIC of the control group and the model group under both negative and positive ionization modes

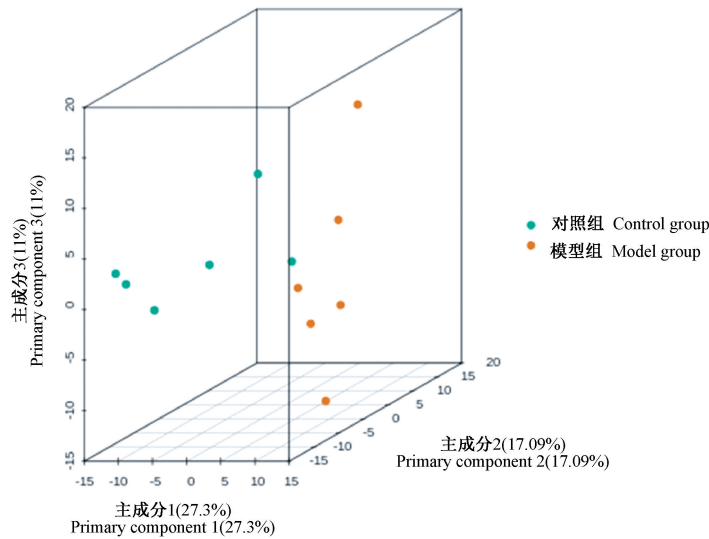


图 4 三维 PCA 图

Figure 4 Three-dimensional PCA diagram

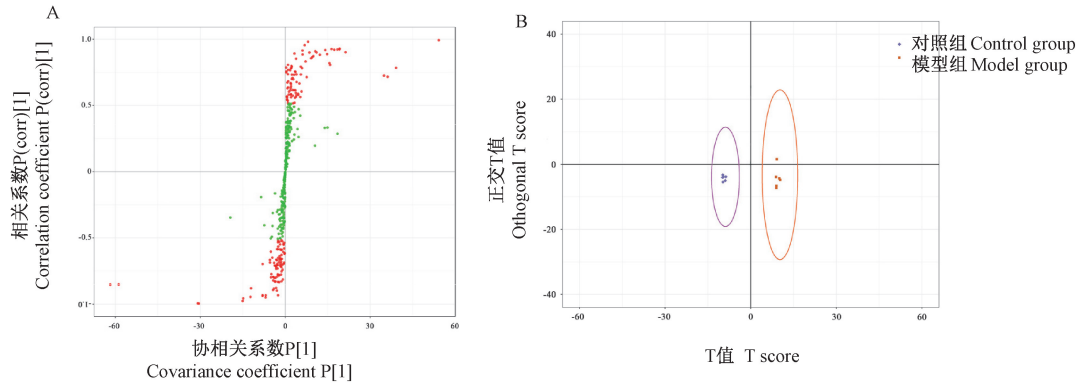


图 5 两组 OPLS-DA 得分图和 S-plot 图

Figure 5 OPLS-DA score plot and S-plot of the two groups

2.6 差异代谢物鉴定

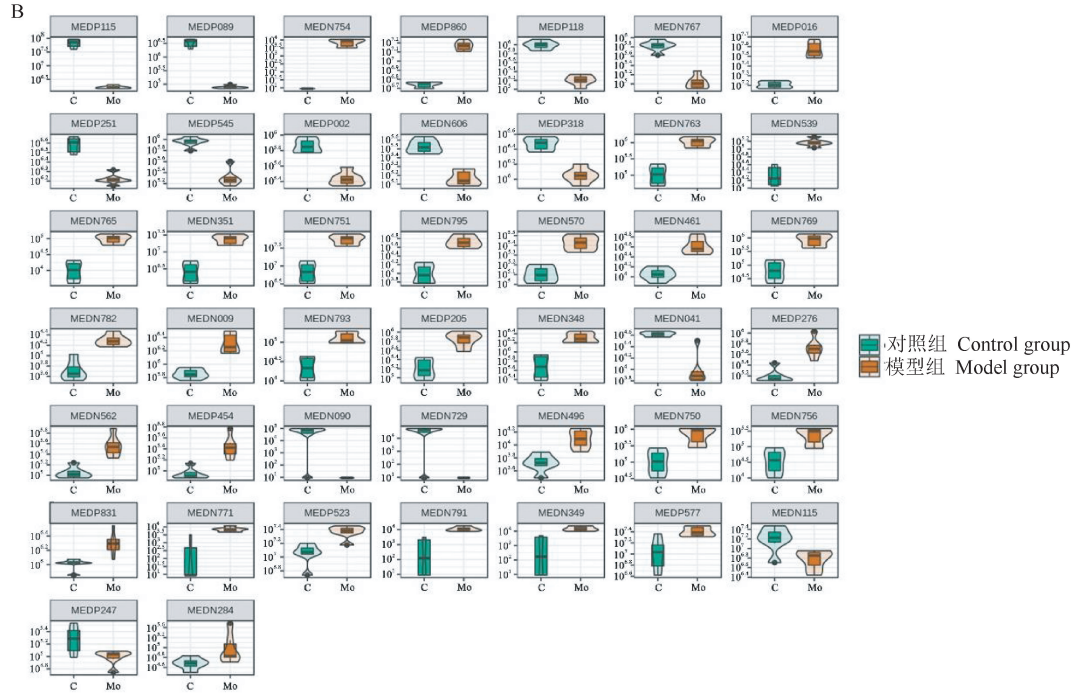
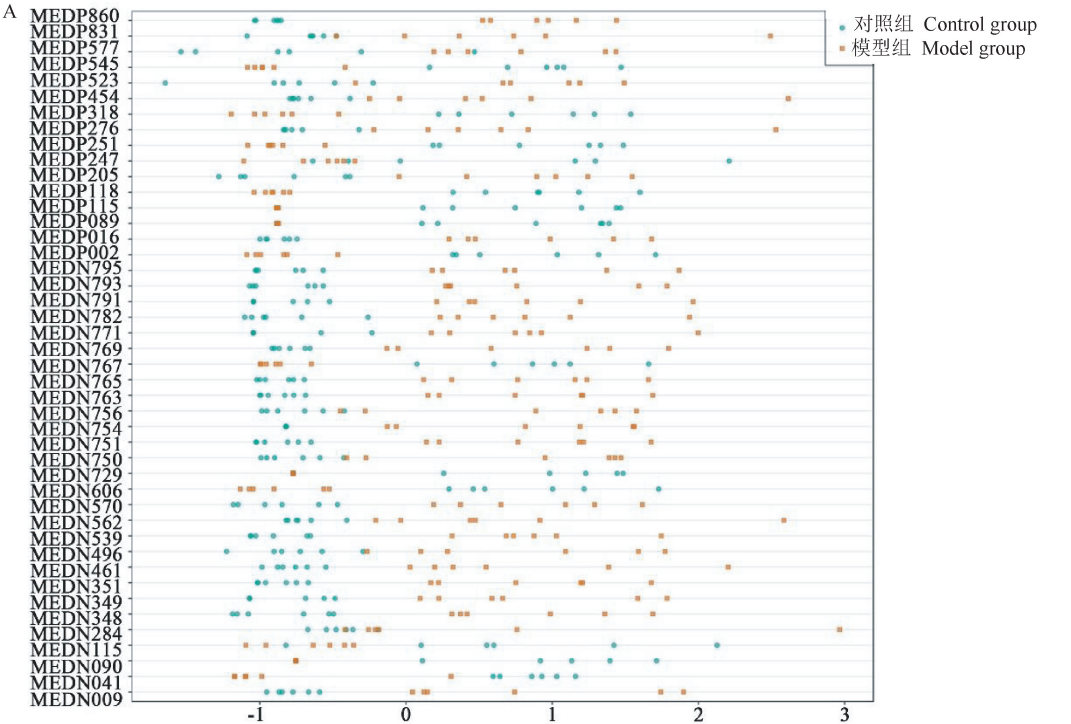
最终共鉴定出组间潜在标志性代谢差异物 44 个,其中 14 个下调,30 个上调(见表 2)。通过 Z 值图可直观地观察到每个差异代谢物在不同组间的分布情况(绿色为对照组,橙黄为模型组)(见图 6A)。各个差异代谢物在两组大鼠中血清中的相对含量如小提琴图所示(图 6B)。差异代谢物聚类热图如图 6C

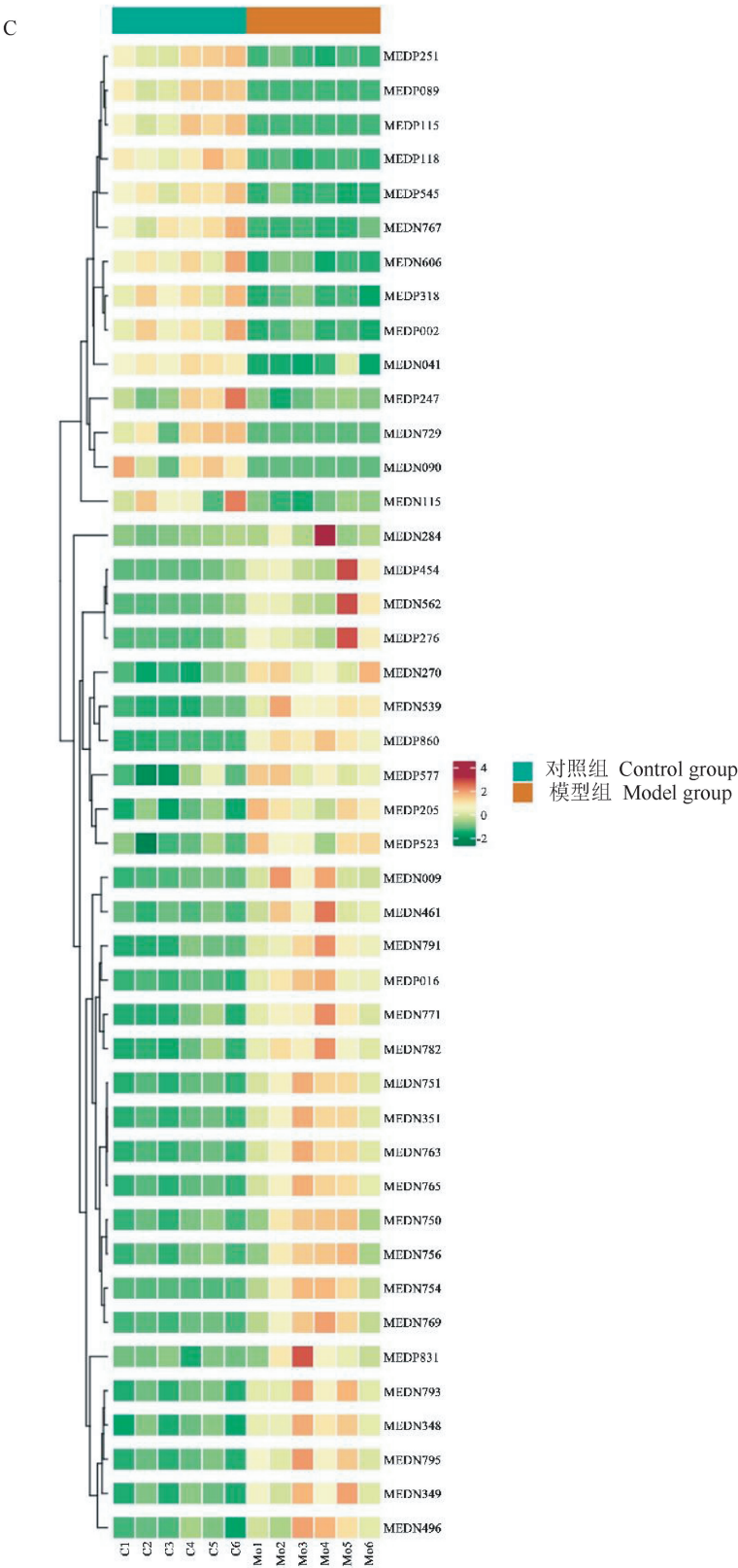
所示,每行代表每个代谢物在不同组大鼠血清中的表达量,每列代表每个样本中所有代谢物的表达量,树状图表示的是不同血清样本的各代谢产物之间的聚类关系(图中红色为上调,绿色为下调),结果反映模型组较对照组有显著差异。就有显著差异的代谢物绘制 Pearson 相关性热图如图 6D,红色表示正相关性较强,绿色表示负相关性较强。

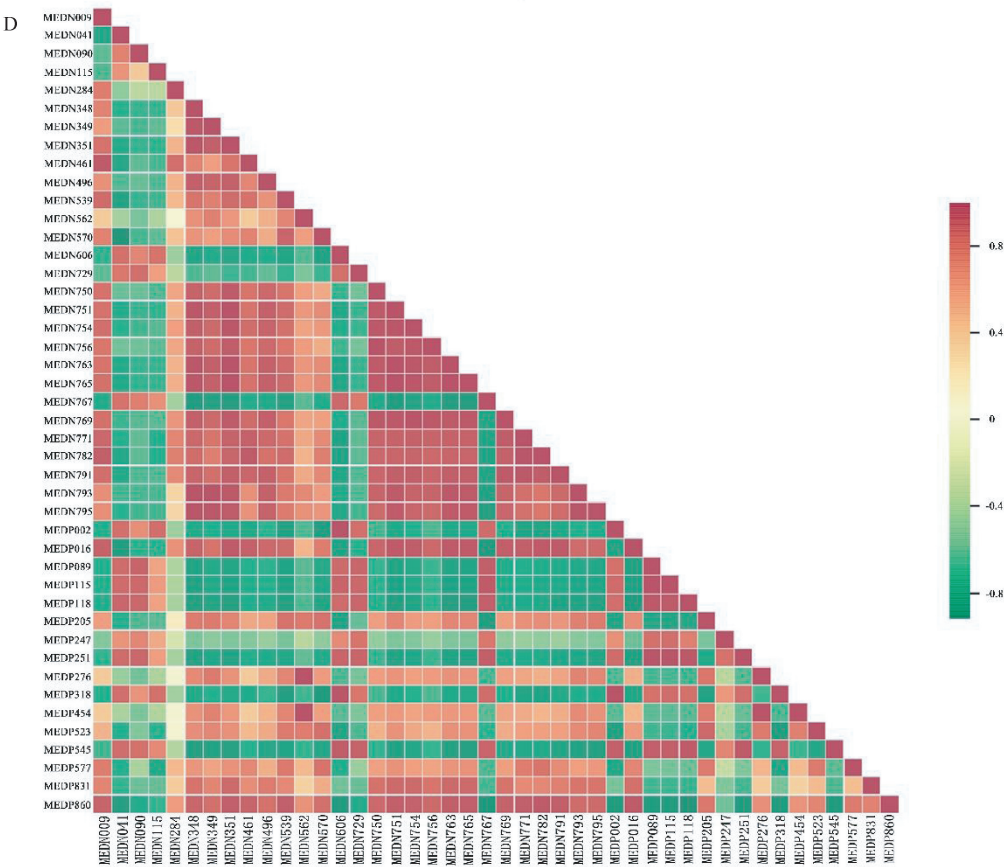
表 2 差异性生物标志物信息

Table 2 Biological information of significant biomarkers

编号 No.	名称 Name	分子式 Formula	变量重要性投影 VIP	倍数变化 Fold change	趋势 Trend
MEDN009	L-天冬氨酸 L-aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	1.75	2.95	↑
MEDN041	己酰甘氨酸 Hexanoylglycine	C ₈ H ₁₅ NO ₃	1.71	0.28	↓
MEDN090	邻甲氧基苯甲酸 2-Methoxybenzoic acid	C ₈ H ₈ O ₃	1.66	0.00	↓
MEDN115	鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	1.36	0.36	↓
MEDN284	2-羟基-4-甲基戊酸 2-Hydroxyisocaproic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	1.10	2.37	↑
MEDN348	血栓素 B2 TXB2	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	1.72	3.89	↑
MEDN349	前列腺素 D2 PGD2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	1.40	7.66	↑
MEDN351	12-羟二十烷四烯酸 12-Hete	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.80	8.17	↑
MEDN461	D-景天庚酮糖 7-磷酸 D-sedoheptulose-7-phosphate	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	1.77	3.74	↑
MEDN496	N-乙酰基蛋氨酸 N-acetylmethionine	C ₇ H ₁₃ NO ₃ S	1.62	2.40	↑
MEDN539	3'-N-乙酰神经氨酸基乳糖钠盐 3'-Sialyllactose	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉	1.81	6.51	↑
MEDN562	吲哚-3-甲醇 Indole-3-carbinol	C ₈ H ₉ NO	1.69	3.44	↑
MEDN570	L-赤藓酮糖 L-Erythrulose	C ₄ H ₈ O ₄	1.78	2.10	↑
MEDN606	5-甲氧基吲哚-3-乙醇 5-Methoxytryptophol	C ₁₁ H ₁₃ NO ₂	1.82	0.44	↓
MEDN729	苯氧乙酸 Phenoxyacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	1.66	0.00	↓
MEDN750	(±)-12-羟基-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-二十碳五烯酸 (±)12-HEPE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	1.60	5.86	↑
MEDN751	(±)12-羟基-5Z,8Z,10E,14Z-二十碳四烯酸 (±)12S-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.80	7.29	↑
MEDN754	(±)17-羟基-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-二十二碳六烯酸 (±)17-HDHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	1.94	834.84	↑
MEDN756	(±)-18-羟基-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-二十碳五烯 (±)18-HEPE	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	1.57	5.91	↑
MEDN763	(±)-9-羟基-5Z,7E,11Z,14Z-二十碳四烯酸 (±)9-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.81	9.08	↑
MEDN765	(±)11,(12)-环氧-5Z,8Z,14Z-二十碳三烯酸 11(12)-EET	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.80	8.83	↑
MEDN767	(±)12,(13)环氧-9Z-十八碳烯酸 12(13)-EpOME	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	1.87	0.17	↓
MEDN769	14S-羟基-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-二十二碳六烯酸 14(S)-HDHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	1.76	11.45	↑
MEDN771	15-氧代-5Z,8Z,11Z,13E-二十碳四烯酸 15-Oxo-EET	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	1.53	8.74	↑
MEDN782	(±)8,9-环氧-5Z,11Z,14Z-二十碳三烯酸 8,9-EET	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1.76	3.63	↑
MEDN791	前列腺素 D1 PGD1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	1.41	9.71	↑
MEDN793	前列腺素 E2 PGE2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	1.73	5.22	↑
MEDN795	前列腺素 F2α PGF2α	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	1.79	5.17	↑
MEDP002	D-高半胱氨酸 D-homocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ S	1.83	0.38	↓
MEDP016	L-谷氨酸 L-glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	1.86	2.33	↑
MEDP089	乙酰基组胺 N-acetylhistamine	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	1.94	0.02	↓
MEDP115	1,4-二氢-1-甲基-4-氧代-3-吡啶甲酰胺 1,4-dihydro-1-methyl-4-oxo-3-pyridinecarboxamide	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	1.94	0.02	↓
MEDP118	4-吡哆酸 4-Pyridoxic acid	C ₈ H ₉ NO ₄	1.90	0.16	↓
MEDP205	L-肉碱 L-Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	1.73	2.07	↑
MEDP247	烟酰甘氨酸 Nicotinuric acid	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	1.30	0.49	↓
MEDP251	葫芦巴碱 Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	1.85	0.43	↓
MEDP276	吲哚-3-甲醛 Indole-3-carboxaldehyde	C ₉ H ₇ NO	1.70	3.49	↑
MEDP318	犬尿氨酸 Kinurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	1.82	0.38	↓
MEDP454	异喹啉 Isoquinoline	C ₉ H ₇ N	1.67	3.27	↑
MEDP523	DL-肉碱 DL-carnitine	C ₇ H ₁₆ ClNO ₃	1.52	2.01	↑
MEDP545	2-吡咯烷酮 2-pyrrolidinone	C ₄ H ₇ NO	1.84	0.24	↓
MEDP577	异丁酰肉碱 Isobutyryl carnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	1.39	2.21	↑
MEDP831	DL-1-氨基-2-丙醇 1-aminopropan-2-ol	C ₃ H ₉ NO	1.54	2.01	↑
MEDP860	谷氨酸盐 Glutamate	C ₅ H ₉ NO ₄	1.91	2.68	↑







注:A:差异代谢物 Z 值图;B:差异代谢物小提琴图;C:差异代谢物聚类热图;D:差异代谢物相关性热图。

图 6 差异代谢物分析

Note. A. Z value plot of significant metabolites. B. Violin graph of significant metabolites. C. Heatmap of significant metabolites' hierarchical clustering analysis. D. Heatmap of correlation significant metabolites.

Figure 6 Analysis of significant metabolites

2.7 KEGG 通路分析

通过 KEGG 对所有标志性差异代谢物进行功能注释和通路富集分析,最终取 $P < 0.05$ 排名前 20 的信号通路绘制成气泡图,发现:SHR 的体内代谢通路途径主要涉及神经活性受体配体相互作用、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 突触传导通路、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢、烟酸和烟酰胺代谢、组氨酸代谢等代谢途径 (见图 7)。结合本研究结果和 KEGG 参考数据库分析发现,通路主要具体变化如下:(1) 在神经活性受体配体作用途径中,前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、前列腺素 D2 (prostaglandin D2, PGD2)、代谢型谷氨酸受体 (glutamate metabotropic receptors, GRMs) 出现上调;(2) 在 5-HT 突触传导通路中环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acid, EETs)、前列腺素 (prostaglandins, PGs)、血栓素 (thromboxanes, TXs) 出现上调,共同影响下游的信号传导、神经内分泌

活动、铁离子调节、突触前抑制和 AA 代谢过程;(3) 在 AA 代谢途径中则主要出现了 PGE2、PGD2、血栓素 B2 (thromboxane B2, TXB2)、15-氧化二十碳四烯酸 (15-oxo-Eicosatetraenoic acid, 15-oxo-EETE)、8,9-环氧二十碳三烯酸 (8, 9-epoxyeicosatrienoic acid, 8,9-EET) 的表达升高。

3 讨论

高血压病是遗传与环境相互作用所致的疾病,目前其发病机制尚未完全阐明。2015 中国高血压调查报告显示,中国 ≥ 18 岁居民高血压患病粗率为 27.9%,而控制率仅 16.8%^[11];持续的高血压状态会造成血管损伤致使动脉斑块形成或出现狭窄、心脏负荷变大引起左室肥厚、肾小球内囊压力增高导致肾纤维化,最终造成患者死亡。代谢组学是能够直接反映机体疾病状态与代谢物表型变化的系统方法,通过它寻找持续高血压状态下机体产生的

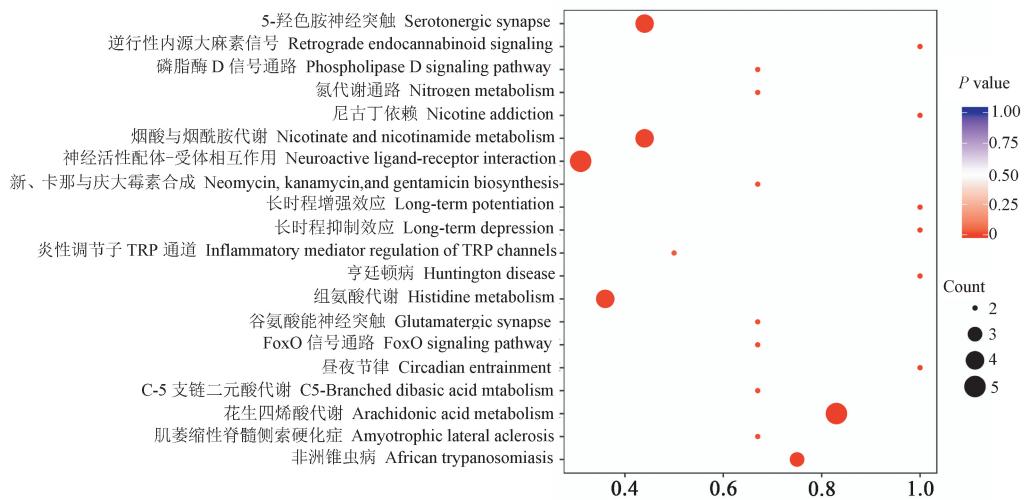


图 7 差异代谢物 KEGG 富集

Figure 7 KEGG enrichment of significant metabolites

变化和特点或许可以为高血压的诊治提供新的思考角度。本研究着眼于血清代谢组学对比发现,持续性高血压状态 SHR 与对照组比较,除体重轻,血压高,血管和心肌组织出现纤维化外,血清代谢组的最大改变是 PGs、TXs、EETs、15-oxoETE、GRM 的上调,而这些物质主要参与了神经活性受体配体相互作用、5-HT 突触传导通路、AA 代谢等代谢途径。

游离的 AA 经环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 作用可生成 PGs、前列环素和血栓素 A2 (thromboxane A2, TXA2)。TXA2 不稳定,在水溶液中可迅速降解为 TXB2;此外,AA 还可在不同亚型细胞色素 P450 单氧酶 (cytochromes P450, CYPs) 作用下产生多种环氧化物,如氧化 EETs 和羟基二十碳四烯酸 (hydroxyeicosatetraenoic acids, HETEs),而 HETEs 经特殊脱氢酶作用后可生成 oxo-EETs^[12]。这些衍生物联同 AA 均具有很强的生物活性,参与心血管系统的复杂调节过程。本研究中发现升高的 PGs、TXs、EETs、15-oxo-ETE 既是 AA 途径过程的代谢产物,又分别影响神经活性受体的激活和 5-HT 突触信号的传导,在高血压发生发展中具有重要作用。首先,PGE2 能够介导血管舒缩,主要是通过 1-4 型不同 PGE2 受体 (E-Prostanoid receptors, EPs) 的结合参与全身血压的双向调节,若调节失衡则可能导致高血压。既往研究显示,PGE2 可通过抑制具有血管收缩性的 EP1 引起的钙离子内流以及 EP3 介导的 cAMP 激活致使血管张力升高,发挥升压作用;相反,其可通过结合血管松弛性 EP2 和 EP4 促进胞内合成 cAMP 激活腺苷酸环化酶途径产生降压效应^[13]。PGD2 是在大鼠、人和其他哺乳动

物脑中发现的最为丰富的 PGs,其参与体温、睡眠和激素调节,并具有抗血小板凝集、诱导血管舒张与调控炎症的作用^[14]。研究发现,抑制 PGD2 合成和其信号传导对 Krabbe's 病小鼠的神经炎症具有抑制作用^[15];而 PGD2 又能通过增加局部的血流促进炎症的发展^[14]。不仅如此,PGE2 和 PGD2 在血管炎症引起的动脉粥样硬化过程中呈反向调节,二者的平衡决定了 COX 的活性以及最终的结果是促炎还是抑炎^[16]。TXs 具有缩血管、升血压及促血小板激活的作用。研究发现,AA 和 TXB2 浓度在高血压患者中明显升高且随病情加重,二者的水平与血压呈正相关^[17-18];而 TXA2 可促进血小板释放 5-HT 和 ADP 引起血小板聚集,同时增强白细胞与内皮之间的黏附加重血管炎症。此外动物实验证明,过表达 CYP 表氧化酶基因可升高 EETs 并有效降压,而使用药物抑制该酶活性则可回升血压^[19];通过抑制 EETs 水解酶活性升高 EETs 同样可以使血压下降^[20]。研究发现,oxo-EETs 是过氧化物增殖酶受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 的内源性配体^[12],而 PPARs 的激活对 SHR 血压升高和靶器官损害均有抑制作用^[21]。单核和巨噬细胞的激活可引起 15-oxo-ETE 的产生^[22],且 15-oxo-ETE 被发现可抑制内皮细胞的增殖,可能具有抑制血管生成的作用^[12]。除此之外,CYPs 的氧化代谢产物可抑制血小板 COX 活性,降低 TXs 水平,抑制血小板聚集,降低血压;而 PGD2 可在维持与 ADP、5-HT 等促血小板凝集因子的平衡中与 CYPs 系统发挥协同作用。由此可见,AA 代谢途径在高血压发病中具有复杂的多面效应,本研究中

SHR 血压的升高是 AA 代谢途径中诸多活性物质综合作用的共同结果。

GRM 的上调是本研究中的血清代谢组的另一重要改变。GRM 是 G 蛋白偶联受体超家族的一员,其可与兴奋性神经递质谷氨酸结合并参与调节神经突触活动与交感信号输出继而影响血管的舒缩和压力。研究发现,下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)中升高的谷氨酸会刺激引起 SHR 交感神经信号外流的增加,并且 PVN 中 I 型 GRM 的活性增强可直接促进 SHR 交感性血管收缩激活,使血压升高^[23];而 PVN 中 II 型 GRM 的激活则可通过减少谷氨酸能信号传入抑制交感活性^[24]。下丘脑中的 AT1 受体可经由内源性配体激活后参与维持 GRM 活性,并通过升高蛋白激酶 C 水平增强高血压动物模型的交感信号输出,抑制内源性 AT1 受体和蛋白激酶 C 活性进而降低高血压动物的血压和减少交感神经放电^[25]。此外,本研究也进一步证实了 5-HT 信号传导通路在高血压中的作用。研究显示,中枢与外周的 5-HT 活性和水平与整个脉管系统密切相关,也与高血压联系紧密;而其发挥作用的关键在于其与血管上各种 5-HT 受体的亲和力,不同的受体介导的作用不同^[26]。如 5-HT 2A 具有很强的缩血管作用,而 5-HT 1B/1D 受体可以通过介导抑制交感神经末端释放去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)减弱血管收缩^[27]。脑内 5-HT 参与调节血压很可能是通过改变传出神经的交感活性来实现的,其过程十分复杂且根据实验条件和研究对象不同而不同,甚至双向矛盾。如静脉注射 5-HT 水平可引起大鼠外周交感活性信号减低进而出现血压下降^[28],而向大鼠脑室内注射 5-HT 可引发高血压^[29]。位于中线延髓的 5-HT 神经元激活会引起血压下降和交感神经放电减少^[30];而位于前海马区的孤立束状核或中缝核群的 5-HT 信号会升高血压^[31]。外周 5-HT 主要通过调节交感神经系统调控血管和血压。交感神经末梢可释放 NE 等引起血管平滑肌收缩,而 NE 的释放受含 5-HT 在内的负反馈系统的调节^[32]。此外,5-HT 还参与调节谷氨酸能神经元活动调节心血管系统,但具体的生理作用过程尚未完全清楚^[33]。

综上所述,AA 代谢、GRM 以及 5-HT 介导的神经传导效应在持续高血压状态 SHR 的血压升高与高血压病的发生发展中均发挥了多重效应,这 3 条途径中产生的代谢物之间存在复杂的网络交互作

用,共同影响高血压病的进展。然而,本实验中代谢产物发生变化调动的多维网络调控机理仍需全面系统地设计实验加以阐明,5-HT 调节剂或 COX 抑制剂用于调控血压的可行性和效果也有待进一步研究验证与观察。

参 考 文 献(References)

- [1] Cifkova R, Fodor G, Wohlfahrt P. Changes in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in high-, middle-, and low-income countries: an update [J]. *Cur Hypertens Rep*, 2016, 18(8): 62.
- [2] Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(8): 634-647.
- [3] Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function [J]. *Circulation*, 2012, 126(9): 1110-1120.
- [4] Ussher JR, Elmariah S, Gerszten RE, et al. The emerging role of metabolomics in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(25): 2850-2870.
- [5] Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 39(1): 77-88.
- [6] Chu Y, Jiang H, Ju J, et al. A metabolomic study using HPLC-TOF/MS coupled with ingenuity pathway analysis: I Intervention effects of Rhizoma Alismatis on spontaneous hypertensive rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 446-452.
- [7] Yu RX, Yang WQ, Qi DM, et al. Targeted neurotransmitter metabolomics profiling of oleanolic acid in the treatment of spontaneously hypertensive rats [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 23276-23288.
- [8] 王焕军, 杨雯晴, 于瑞雪, 等. 基于代谢组学技术的天麻降血压作用研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(3): 324-330.
Wang HJ, Yang WQ, Yu RX, et al. Study on the anti-hypertension of *Gastrodia Elata* based on metabonomic technology [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2020, 40(3): 324-330.
- [9] 韩聪, 周乐, 姜月华, 等. 基于代谢组学探讨黄芪-丹参药对的降压机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(9): 4352-4356.
Han C, Zhou L, Jiang YH, et al. Study on the antihypertensive mechanism of *Astragali Radix* and *Salvia Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* based on metabolomics [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(9): 4352-4356.
- [10] Lu J, Lu Y, Wang X, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China: data from 1.7 million adults in a population-based screening study (China PEACE

- Million Persons Project) [J]. *Lancet*, 2017, 390(10112): 2549–2558.
- [11] Wang Z, Chen Z, Zhang L, et al. Status of hypertension in China: results from the China Hypertension Survey, 2012–2015 [J]. *Circulation*, 2018, 137(22): 2344–2356.
- [12] Powell WS, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(4): 340–355.
- [13] Swan CE, Breyer RM. Prostaglandin E2 modulation of blood pressure homeostasis: studies in rodent models [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011, 96(1–4): 10–13.
- [14] Joo M, Sadikot RT. PGD synthase and PGD2 in immune response [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 503128.
- [15] Mohri I, Taniike M, Taniguchi H, et al. Prostaglandin D2-mediated microglia/astrocyte interaction enhances astrogliosis and demyelination in twitcher [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4383–4393.
- [16] 郭歌, 祖凌云, 高炜, 等. 花生四烯酸代谢产物与动脉粥样硬化 [J]. *心血管病学进展*, 2014, 35(5): 526–530.
Guo G, Zu LY, Gao W, et al. Metabolites of arachidonic acid and atherosclerosis [J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2014, 35(5): 526–530.
- [17] Zheng ZJ, Folsom AR, Ma J, et al. Plasma fatty acid composition and 6-year incidence of hypertension in middle-aged adults: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *Am J Epidemiol*, 1999, 150(5): 492–500.
- [18] Dołęgowska B, Błogowski W, Kedzierska K, et al. Platelets arachidonic acid metabolism in patients with essential hypertension [J]. *Platelets*, 2009, 20(4): 242–249.
- [19] Liu X, Wu J, Liu H, et al. Disturbed ratio of renal 20-HETE/EETs is involved in androgen-induced hypertension in cytochrome P450 4F2 transgenic mice [J]. *Gene*, 2012, 505(2): 352–359.
- [20] 应志强, 徐耕. 环氧化物水解酶在高血压治疗中的作用及其机制研究进展 [J]. *中国现代应用药理学*, 2008, 25(6): 506–508.
Ying ZQ, Xu G. Progress on the treatment for hypertension of epoxide hydrolase and its mechanisms [J]. *Chin J Modern Appl Pharm*, 2008, 25(6): 506–508.
- [21] Chen LY, Pan CS, Wei XH, et al. Sang-qì granula reduces blood pressure and myocardial fibrosis by suppressing inflammatory responses associated with the peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappa b protein in spontaneously hypertensive rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 721–729.
- [22] Wei C, Zhu P, Shah SJ, et al. 15-oxo-Eicosatetraenoic acid, a metabolite of macrophage 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase that inhibits endothelial cell proliferation [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 76(3): 516–525.
- [23] Li DP, Pan HL. Increased group I metabotropic glutamate receptor activity in paraventricular nucleus supports elevated sympathetic vasomotor tone in hypertension [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299(2): 552–561.
- [24] Ma H, Chen SR, Chen H, et al. Endogenous AT1 receptor-protein kinase C activity in the hypothalamus augments glutamatergic input and sympathetic outflow in hypertension [J]. *J Physiol*, 2019, 597(16): 4325–4340.
- [25] Ye ZY, Li DP, Pan HL. Regulation of hypothalamic presympathetic neurons and sympathetic outflow by group II metabotropic glutamate receptors in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2013, 62(2): 255–262.
- [26] Watts SW, Morrison SF, Davis RP, et al. Serotonin and blood pressure regulation [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(2): 359–388.
- [27] Gilmore B, Michael M. Treatment of acute migraine headache [J]. *Am Fam Physician*, 2011, 83(3): 271–280.
- [28] Villalón CM, Contreras J, Ramírez-San JE, et al. 5-Hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats [J]. *Life Sci*, 1995, 57(8): 803–812.
- [29] Anderson IK, Martin GR, Ramage AG. Central administration of 5-HT activates 5-HT1A receptors to cause sympathoexcitation and 5-HT2/5-HT1C receptors to release vasopressin in anesthetized rats [J]. *Br J Pharmacol*, 1992, 107(4): 1020–1028.
- [30] Bergamaschi CT, Silva NF, Pires JG, et al. Participation of 5-HT and AT1 receptors within the rostral ventrolateral medulla in the maintenance of hypertension in the goldblatt 1 Kidney-1 clip model [J]. *Int J Hypertens*, 2014, 2014: 723939.
- [31] Koshiya N, Guyenet PG. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(6): 1273–1278.
- [32] 陈鸿驰. 血浆 5-羟色胺对心血管功能的调节 [J]. *生理科学进展*, 1984, 15(2): 172–174.
Chen HC. Regulation of cardiovascular function by plasma 5-hydroxytryptamine [J]. *Prog Physiol Sci*, 1984, 15(2): 172–174.
- [33] Ramage AG, Villalón CM. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(9): 472–481.

[收稿日期] 2020-11-24