

赵亚茹, 韩怡, 朴婧羽, 等. 基于 UPLC-MS 技术探究糖脂代谢病的血清代谢谱特征 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 24-35.

Zhao YR, Han Y, Piao JY, et al. Characteristics of the serum metabolic spectrum of glucolipid metabolic disease by UPLC-MS [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 24-35.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.004

基于 UPLC-MS 技术探究糖脂代谢病的血清代谢谱特征

赵亚茹^{1,2}, 韩怡^{1,2}, 朴婧羽^{1,2}, 罗朵生^{1,2*}

(1.糖脂代谢病教育重点实验室, 广东药科大学, 广州 510006;
2.广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广东药科大学, 广州 510006)

【摘要】 目的 旨在分析非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2D) 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的血清代谢组学谱特征。**方法** 分别建立 NAFLD、T2D 和 AS 小鼠模型, 采用液质联用 (ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS) 技术分析小鼠血清代谢谱, 基于 R 语言 MetaboAnalystR 包分析数据, 结合多元统计学方法筛选差异代谢物, 通过非靶向 KEGG 富集分析获得差异代谢通路, 最后将差异代谢物与血脂进行关联分析。**结果** NAFLD、T2D 和 AS 共同拥有 48 种差异代谢物, 主要富集在亚油酸代谢、磷酸戊糖代谢、花生四烯酸代谢和组氨酸代谢通路 ($P < 0.05$), 且差异代谢物与血脂显著相关。与对照组相比, NAFLD、T2D 和 AS 主要个性代谢通路分别为 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢 ($P = 0.09$), 半乳糖代谢、初级胆汁酸生物合成和淀粉和蔗糖代谢 ($P < 0.05$), 鞘脂代谢和嘧啶代谢 ($P < 0.05$)。三种疾病两两相比, 在 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢 ($P = 0.12$)、淀粉和蔗糖代谢 ($P < 0.01$)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 ($P < 0.05$)、酮体的合成与降解 ($P = 0.06$)、鞘脂类代谢 ($P < 0.05$)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解 ($P < 0.05$)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 ($P < 0.05$) 和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢 ($P = 0.12$) 等通路存在差异。**结论** 从代谢组学角度解析了 NAFLD、T2D 与 AS 的共性和个性特征, 为上述疾病的综合防治和个性化治疗提供线索。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 2 型糖尿病; 动脉粥样硬化; UPLC-MS; 代谢组学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0024-12

Characteristics of the serum metabolic spectrum of glucolipid metabolic disease by UPLC-MS

ZHAO Yaru^{1,2}, HAN Yi^{1,2}, PIAO Jingyu^{1,2}, LUO Duosheng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Glucolipid Metabolic Diseases, Ministry of Education, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China. 2. Guangdong Provincial TCM Key Laboratory for Metabolic Diseases, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To analyze the serum metabolomics of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), type 2 diabetes mellitus (T2D), and atherosclerosis (AS). **Methods** NAFLD, T2D, and AS mouse models were established,

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81830113, 82074210); 广东省重大基础及应用基础研究 (2019B030302005)。

【作者简介】 赵亚茹 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效评价与应用研究。E-mail: Z15579089869@163.com

【通信作者】 罗朵生 (1983—), 女, 研究员, 研究方向: 中药药效评价与应用研究。E-mail: lds0901@163.com

and serum metabolomics were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Data were analyzed using the R language MetaboAnalystR package. Differential metabolites were screened by multivariate statistics. Differential metabolic pathways were obtained by untargeted KEGG enrichment analysis. The result were analyzed for correlations between differential metabolites and blood lipids. **Results** NAFLD, T2D and AS shared 48 differential metabolites that were particularly enriched in linoleic acid metabolism, pentose phosphate metabolism, arachidonic acid metabolism, and histidine metabolism pathways ($P < 0.05$). The differential metabolites were significantly correlated to blood lipids. Compared with the control group, the main specific metabolic pathways of NAFLD, T2D and AS were D-arginine and D-ornithine metabolism ($P = 0.09$), galactose metabolism, primary bile acid biosynthesis, starch, and sucrose metabolism ($P < 0.05$), and sphingolipid and pyrimidine metabolism ($P < 0.05$), respectively. The three diseases were compared pairwise, and there were differences in D-arginine and D-ornithine metabolism ($P = 0.12$), starch and sucrose metabolism ($P < 0.01$), D-glutamine and D-glutamate metabolism ($P < 0.05$), synthesis and degradation of ketone bodies ($P = 0.06$), alanine, aspartate and glutamate metabolism ($P < 0.05$), sphingolipid metabolism ($P < 0.05$), valine, leucine and isoleucine degradation ($P < 0.05$), and glycine, serine, and threonine metabolism ($P = 0.12$). **Conclusions**

This study revealed the common and specific metabolic characteristics of NAFLD, T2D and AS, and provides for a research direction for comprehensive prevention and individualized treatment of these diseases.

[Keywords] non-alcoholic fatty liver disease; type 2 diabetes mellitus; atherosclerosis; UPLC-MS; metabolomics

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

随着社会、经济 and 环境的转变,高糖高脂饮食和久坐不动的生活方式使得机体糖脂代谢处于紊乱状态,导致 NAFLD、T2D 与 AS 等代谢性疾病发病率不断攀升,严重影响人类健康。研究表明,肥胖、血脂异常、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和高血压等均为 NAFLD 和 T2D 的共同致病因素^[1]。且两种疾病并存可相互恶化,T2D 患者并发 NAFLD 概率高达 55%^[2]。NAFLD 通过加剧肝和外周胰岛素抵抗,使其并发 T2D 风险升高约两倍^[3]。长期糖脂代谢紊乱还导致全身神经、大血管、微血管病变,AS 是糖尿病大血管病变常见慢性并发症,也是 T2D、NAFLD 患者死亡的主要原因^[4-5]。除此之外,内皮功能障碍、低度炎症、氧化应激和 IR 也是 NAFLD 和 AS 病变过程共同致病风险^[6-7]。可见,NAFLD、T2D 和 AS 三者之间密切相关。

广东药科大学郭姣教授团队^[8]在临床实践、文献溯源、流行病学调查和科学实验的基础上,在中医整体观指导下,提出将高血糖、血脂失调、非酒精性脂肪性肝病及动脉粥样硬化等糖脂代谢性疾病进行整体认识和一体化治疗,命名为“瘴浊·糖脂代谢病(glucolipid metabolic diseases, GLMD)”。但上述疾病的共性和个性代谢特征有待进一步阐明。代谢组学通过分析宏观代谢物的变化来揭示微观基因的变化,适用于阐述所研究生物系统受到干扰和刺激(如特定基因变异或环境改变)后代谢物的变化^[9]。本研究使用 UPLC-MS 技术分析 NAFLD、T2D 与 AS 小鼠血清代谢物,从代谢组学的角度探

索 NAFLD、T2D 与 AS 的共性与特性,为研究糖脂代谢性疾病相关靶点及药物开发贡献力量。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 30 只,7~8 周龄,体重 19~21 g,来源于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2022-0002]。SPF 级 ApoE^{-/-}雄性小鼠 10 只,7~8 周龄,19~21 g,来源于常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK(苏)2021-0013],所有实验均在广东药科大学实验动物中心 SPF 环境中完成[SYXK(粤)2022-0125]。相对湿度(60%±20%),环境温度(24±2)℃,光照/黑暗(12 h/12 h),每笼饲养 5 只小鼠,每周二、周五更换新的垫料盒和无菌水瓶,动物摄食与饮水自由。实验方案及过程获得广东药科大学实验动物中心伦理委员会批准(GDPULOUSPF2017310)。所有的操作均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号:20211010、20211010、20211210、20211210,南京建成生物工程研究所,中国);甲醇、乙腈(批号:219089、220899,Thermo,美国);2-氯苯丙氨酸(批号:A2215290,Aladdin,中国);甲酸(批号:L6SZA,TCI,日本);甲酸铵(批号:215929, Sigma,德国);超纯水(Millipore,美国)。

液相色谱仪(型号:Vanquish,Thermo,美国);质谱仪(型号:Q Exactive HF-X,Thermo,美国);ACQUITY UPLC® HSS T3 色谱柱(型号:2.1×150 mm,1.8 μm,Waters,美国);冷冻离心机(型号:H1850-R,湘仪,中国);混匀仪(型号:QL-866,Vortex Mixer,德国);真空浓缩仪(型号:5305,Eppendorf,德国);滤膜(型号:0.22 μm PTFE,津腾,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型建立

参照文献中构建 NAFLD^[10]、T2D^[11]和 AS^[12]疾病模型的方法,课题组前期已成功构建了 NAFLD^[13]、T2D^[14]和 AS^[15]小鼠模型。具体方法如下:小鼠于 SPF 环境中适应性喂养 1 周后,将 C57BL/6J 小鼠每组 10 只,随机分为 3 组:对照(CON)组、NAFLD 组和 T2D 组,CON 组给予普通饲料喂养 10 周,NAFLD 组给予高脂饮食诱导 10 周造模;T2D 组采用腹腔注射 STZ(40 mg/kg 的剂量连续注射 4 d,令空腹血糖≥11.1 mmol/L)联合高脂饮食诱导 10 周造模。AS 组给予 ApoE^{-/-}雄性小鼠高脂饮食诱导 10 周造模。

1.3.2 血清生化指标测定

禁食 12 h 后取材,采用异氟烷麻醉小鼠,采集腹主动脉血于 Eppendorf 管中,总取血量约为 0.8 mL,室温静置 30 min 后,于 3500 r/min,4℃ 条件下离心 20 min,取上层血清,-80℃ 冻存储备用。参照试剂盒说明书检测血脂水平。

1.3.3 血清非靶向代谢组学分析

(1) 样本处理

使用前血清样本 4℃ 条件下融化,取 100 μL 于 2 mL 离心管中,每管加 400 μL 甲醇,充分混匀后于 12 000 r/min,4℃ 条件下离心 10 min 后,分离上清并真空浓缩干燥,取 150 μL 2-氯苯丙氨酸(4 ppm)80%甲醇溶液复溶,0.22 μm 滤膜过滤制得待测样品。各待测样品取 20 μL 混合成 QC 样本,各剩余待测样本进行 UPLC-MS 检测。

(2) 色谱条件

采用 Thermo Vanquish 液相色谱仪,使用 ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μm(2.1 mm×150 mm)色谱柱,自动进样器温度为 8℃,流速为 0.25 mL/min,柱温为 40℃,进样 2 μL 梯度洗脱,流动相为正离子 0.1%甲酸水(A1)-0.1%甲酸乙腈(B1);负离子 5 mmol/L 甲酸铵水(A2)-乙腈(B2)。梯度洗脱程序为 0~1 min,2% B2/B1;1~9 min,2%~50%

B2/B1;9~12 min,50%~98% B2/B1;12~13.5 min,98% B2/B1;13.5~14 min,98%~2% B2/B1;14~20 min,2% B1-正模式(14~17 min,2% B2-负模式)。

(3) 质谱条件

使用 Thermo Q Exactive HF-X 质谱仪,电喷雾离子源(ESI),正负离子电离模式,正离子喷雾电压为 3.50 kV,负离子喷雾电压为 2.50 kV,鞘气 30 arb,辅助气 10 arb。毛细管温度 325℃,以分辨率 60 000 进行全扫描,扫描范围 81~1000,并采用 HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

(4) 数据处理

采用 UPLC-MS 技术对 CON 组和 NAFLD、T2D、AS 三种疾病模型小鼠的血清代谢物进行分析,借助 Proteowizard 软件将原始数据转换成 mzXML 格式,R(v3.1.3)的 XCMS 程序包进行峰识别、峰过滤、峰对齐,得到质核比、保留时间及峰面积等信息的数据矩阵,使用 MetaboAnalystR 软件分析样品数据,基于 PLS-DA 模型,以 VIP>1, $P<0.05$ 为筛选标准筛选差异代谢物,非靶向 KEGG 富集分析获得差异代谢通路。借助微科盟平台(<https://www.bioincloud.tech/#/>)将血脂指标与共性差异代谢物进行关联分析,讨论相关性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件统计分析数据,计量结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂水平

血脂指标可以反映疾病进展,预测疾病风险。如表 1 所示,与 CON 组相比,NAFLD、T2D 与 AS 组血清中 TC、TG、LDL-C 含量显著增加,HDL-C 含量显著减少($P<0.01$),表明三种疾病小鼠均出现血脂异常。其中 NAFLD 与 T2D 组血脂水平变化程度相近,AS 组血脂水平变化最显著。

2.2 多元统计分析结果

PCA 分析结果(图 1A)显示,三种疾病组均分布在与对照组不同的区域,表明病变后血清代谢物组成发生较大差异。偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)模型具有良好的预测能力(图 1B),为了滤除与分类信息无关的噪声,提高模型的分析能力和有效

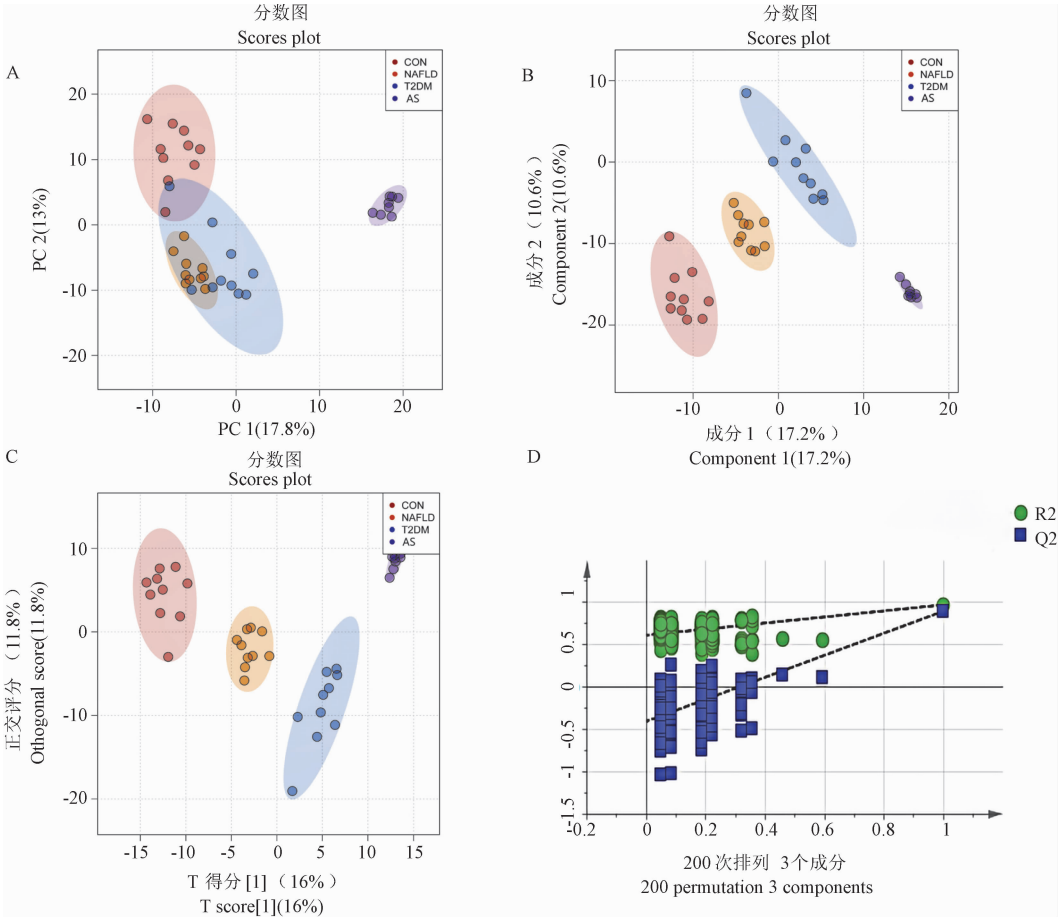
性,我们进一步构建了正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)(图 1C),与对照组相比,三种疾病组血清代谢物组成均发生了显著变化。为判断模型是

否过度拟合,我们进行了置换检验(图 1D),置换检验结果以 Q2 作为检验统计量,Q2 趋近于 1,验证模型稳定,未过拟合。

表 1 各组小鼠血清血脂水平比较 (n=10, mmol/L)
Table 1 Comparison of lipid levels in each group of mice

组别 Groups	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C
对照组 CON group	1.94±0.35	0.27±0.07	0.65±0.16	2.20±0.864
非酒精性脂肪肝组 NAFLD group	5.10±0.25 ⁽⁴⁾	0.68±0.13 ⁽⁴⁾	1.57±0.32 ⁽⁴⁾	1.74±0.27 ⁽²⁾
2 型糖尿病组 T2D group	3.14±0.31 ^{(4)(d)}	1.21±0.37 ^{(4)(d)}	1.70±0.14 ⁽⁴⁾	1.68±0.30 ⁽⁴⁾
动脉粥样硬化组 AS group	11.57±0.62 ^{(4)(d)(iv)}	1.91±0.25 ^{(4)(d)(iv)}	8.04±0.41 ^{(4)(d)(iv)}	1.22±0.24 ^{(4)(d)(ii)}

注:与对照组对比,⁽²⁾P<0.01,⁽⁴⁾P<0.0001;与 NAFLD 组对比,^(d)P<0.0001;与 T2D 组相比,⁽ⁱⁱ⁾P<0.01,^(iv)P<0.0001。
Note. Compared with CON group, ⁽²⁾P<0.01, ⁽⁴⁾P<0.0001. Compared with the NAFLD group, ^(d)P<0.0001. Compared with the T2D group, ⁽ⁱⁱ⁾P<0.01, ^(iv)P<0.0001.



注:A;PCA;B;PLS-DA;C;OPLS-DA;D;置换检验分析图。
图 1 四组小鼠血清代谢组学分析结果
Note. A,PCA. B,PLS-DA. C,OPLS-DA. D,Permutation test.

Figure 1 Analysis of serum metabolomics in four groups of mice

2.3 代谢物含量统计

采用 UPLC-MS 技术分析 CON、T2D、NAFLD 和 AS 的血清代谢物,共检测出 552 种血清代谢物。我们将 552 种血清代谢物用 KEGG 数据库 br08001 进行注释归类,并统计各类代谢物含量,绘制百分比含量堆积柱形图,发现代谢物主要包括多肽类、脂类、核酸、有机酸、维生素和辅因子、类固醇、激素类和递质(见图 2)。

2.4 差异代谢物筛选及其代谢通路的富集分析

2.4.1 差异代谢物筛选

基于 PLS-DA 模型,以 $VIP>1$, $P<0.05$ 为筛选标准,与对照组相比,NAFLD、T2D 和 AS 组分别发现 192、198 与 219 个差异代谢物,包括脂类、蛋白质类、糖类、核酸、有机酸、维生素和辅因子、类固醇、激素类和递质。说明病变后小鼠各类血清代谢物均发生了较大改变。

2.4.2 三种疾病共性代谢物及代谢通路分析

为进一步了解疾病间的共性与个性特点,我们分别在 NAFLD、T2D 和 AS 组的 192、198 与 219 个差异代谢物中找到 48 个相同差异代谢物,其中脂类 20 个,蛋白质类 4 个,糖类 4 个,核酸 2 个,维生素和辅助因子 6 个,类固醇 2 个,激素和递质 1 个,有机酸化合物 6 个,有机氧化物 3 个。这些差异代谢物共富集到 29 条代谢通路,其中亚油酸代谢、磷酸戊糖代谢、花生四烯酸代谢和组氨酸代谢等具有显著性差异($P<0.05$),表 2 展示的是差异代谢通路及对应通路上各组差异代谢物水平(峰面积均值 $\pm$ 标准差)。与对照组相比,三种疾病组血清亚油酸(linoleic acid, LA)水平均降低,其中间代谢物如 9-OxoODE、9 (S)-HPODE、9,10-EpOME、12,13-DHOME、13(S)-HODE 和 9,10-DHOME 水平均显著降低($P<0.001$);NAFLD 和 T2D 组血清中花生四烯酸(arachidonic acid, AA)显著升高($P<0.01$),15-脱氧-d-12,14-PGJ2、前列腺素 E2 在三种疾病中均显著上调($P<0.0001$);三种疾病组血清中葡萄糖酸内酯、7-磷酸景庚酮糖和肌肽水平均升高。病变后小鼠血清差异代谢物发生相似趋势的变化,说明三种疾病病变存在共性特征,聚焦上述共性差异代谢物与代谢通路有助于我们了解疾病共性,可能是未来综合防治糖脂代谢病多病并发的突破点。

2.4.3 个性差异代谢物及代谢通路分析

在关注糖脂代谢性疾病共性代谢特征的同时,关注疾病个性特征也至关重要。分别在三种疾病

筛选的差异代谢物中剔除三组或两组之间共有的差异代谢物,NAFLD、T2D、AS 组分别筛选出 27、36、50 个个性差异代谢物,主要通路富集结果按 P 值大小排序(见表 3),发现 NAFLD 富集的个性代谢通路主要为 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢($P=0.09$),T2D 富集的个性代谢通路主要为半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、初级胆汁酸生物合成($P<0.05$),AS 富集的个性代谢通路主要为鞘脂代谢和嘧啶代谢($P<0.05$)。与对照组相比,NAFLD 组血清中 D-鸟氨酸水平升高;T2D 组 D-1-磷酸葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、D-麦芽糖、鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺胆酸水平均上调;AS 组血清中鞘氨醇、1-磷酸鞘氨醇、3-脱氢二氢鞘氨醇、磷酸胞苷、胞苷、胞嘧啶均显著升高($P<0.001$)。说明三种疾病病变均具有个性化特征,而关注个性化代谢物及代谢通路可能是增益治疗效果的关键。

2.4.4 两种疾病间差异代谢物及代谢通路分析

为了进一步探究疾病间的代谢谱特征,我们将差异代谢物进行两两比较,分析各疾病的差异代谢物及其富集的差异代谢通路。

NAFLD 与 T2D 相比,筛选出 47 个差异代谢物,NAFLD 组小鼠血清中 D-鸟氨酸水平升高,主要富集在 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢通路($P=0.12$);

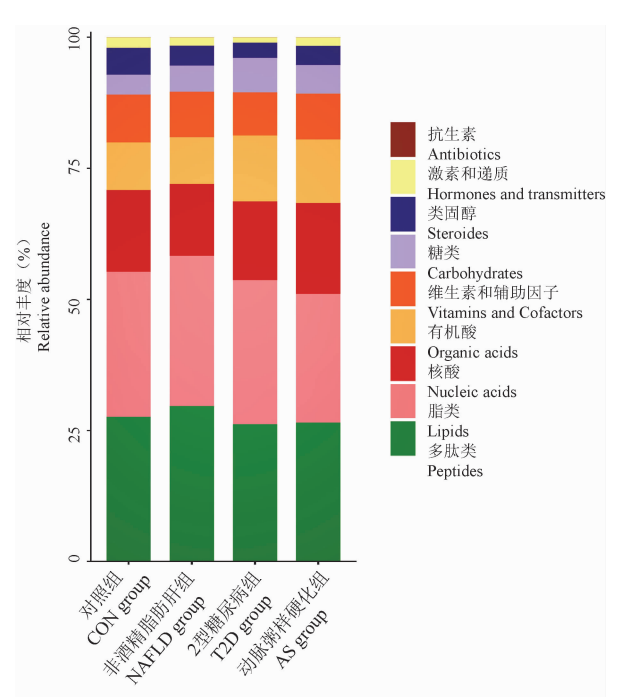


图 2 扮演生物学角色的代谢物百分比堆积柱形图
Figure 2 Percentage accumulation histogram of metabolites playing biological roles

表 2 NAFLD、T2D 和 AS 共性差异代谢物及代谢通路分析 (n = 10)

Table 2 Analysis of common differential metabolites and metabolic pathways in NAFLD, T2D and AS

名称 Names	均值 Means				通路 Pathways	类别 Categories
	对照组 CON group	非酒精性脂肪性 肝病组 NAFLD group	2 型糖尿病组 T2D group	动脉粥样 硬化组 AS group		
亚油酸 Linoleic acid	19 148 589± 7 512 440	14 760 734 ± 3 790 185	13 001 007± 7 390 000 ⁽¹⁾	5 697 648± 2 660 995 ⁽⁴⁾	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	
9(S)-过氧亚油酸 9(S)-HPODE	590 570 720± 326 223 699	57 604 978± 10 861 631 ⁽⁴⁾	7 071 579± 22 923 284 ⁽⁴⁾	128 059 022± 31 532 559 ⁽⁴⁾		
9-氧代十八碳二烯酸 9-OxoODE	79 622 353± 24 134 667	12 846 441± 5 778 747 ⁽⁴⁾	18 118 202± 4 693 831 ⁽⁴⁾	14 363 207± 3 944 219 ⁽⁴⁾		
9, 10-环氧十八碳二烯酸酯 9, 10-EpOME	55 9088 773± 148 467 590	132 340 577± 60 866 090 ⁽⁴⁾	193 177 920± 36 398 158 ⁽⁴⁾	196 792 073± 44 730 774 ⁽⁴⁾		
12, 13-二羟基油酸酯 12, 13-DHOME	44 922 824± 12 319 294	7 813 995± 4 590 410 ⁽⁴⁾	12 116 834± 5 080 856 ⁽⁴⁾	2 142 467± 1 761 572 ⁽⁴⁾		
13(S)-羟基十八碳二烯酸 13(S)-HODE	215 790 093± 8 420 828	52 908 906± 29 808 950 ⁽⁴⁾	69 437 157± 18 636 663 ⁽⁴⁾	44 796 408± 15 863 314 ⁽⁴⁾	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	脂类 Lipids
9, 12, 13-三羟基十八碳烯酸 9, 12, 13-TriHOME	21 097 660± 10 591 493	36 825 840± 7 595 685 ⁽³⁾	35 455 778± 16 461 167 ⁽³⁾	28 052 940± 6 966 214		
9, 10-二羟基十八碳烯酸 9,10-DHOME	92 724 336± 39 908 960	36 067 495± 7 062 354 ⁽⁴⁾	43 311 116± 15 226 143 ⁽⁴⁾	40 858 539± 17 085 381 ⁽⁴⁾		
花生四烯酸 Arachidonic acid	101 451 801± 8 204 543	174 621 250 ± 41 887 592 ⁽²⁾	162 207 667± 72 519 978 ⁽³⁾	110 639 349± 18 187 961		
15-脱氧-d-12, 14-PGJ2 15-deoxy-d-12, 14-PGJ2	81 992 884± 42 852 030	14 163 312± 7 376 530 ⁽⁴⁾	12 060 708± 5 526 812 ⁽⁴⁾	17 744 976± 4 352 459 ⁽⁴⁾		
前列腺素 E2 Prostaglandin E2	51 780 065± 29 613 753	8 012 391± 3 548 423 ⁽⁴⁾	5 007 722± 3 998 822 ⁽⁴⁾	10 045 256± 3 857 070 ⁽⁴⁾	磷酸戊糖代谢 Pentose phosphate pathway	糖类 Glucides
葡萄糖酸内酯 Gluconolactone	36 604 942± 10 507 557	49 602 706± 9 045 193 ⁽⁴⁾	62 952 055± 13 778 300 ⁽⁴⁾	109 904 854± 55 628 604 ⁽⁴⁾		
7-磷酸景庚酮糖 D-sedoheptulose 7-phosphate	25 023 529± 14 863 369	38 319 604± 9 591 299	47 905 129± 27 016 256 ⁽²⁾	50 178 401± 15 946 153 ⁽²⁾		
肌肽 Carnosine	9 451 202± 2 745 665	12 700 674± 3 244 407	15 736 237± 6 840 562 ⁽²⁾	24 566 786± 2 577 520 ⁽⁴⁾		
					组氨酸代谢 Histidine metabolism	蛋白质类 Proteins

注:与对照组对比, ⁽¹⁾ P<0.05, ⁽²⁾ P<0.01, ⁽³⁾ P<0.001, ⁽⁴⁾ P<0.0001。
Note. Compared with the normal group, ⁽¹⁾ P<0.05, ⁽²⁾ P<0.01, ⁽³⁾ P<0.001, ⁽⁴⁾ P<0.0001.

T2D 组小鼠血清中海藻糖、蔗糖、L-谷氨酰胺和氧代戊二酸水平显著升高 (P<0.05), 主要富集在淀粉和蔗糖代谢 (P<0.01) 和 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (P<0.05)。NAFLD 与 AS 组相比, 筛选出 56 个差异代谢物, NAFLD 组小鼠血清中乙酰乙酸水平显著升高 (P<0.05), 主要富集在酮体的合成与降解通路 (P=0.06); AS 组小鼠血清中 L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、N-乙酰基 L-天冬氨酸、N-乙酰甲酰谷氨酸水平显著降低 (P<0.05), D-氨基葡萄糖 6-磷酸、鞘氨醇、鞘氨酸、3-脱氢鞘氨酸和磷酸鞘氨酸水平显著升高 (P<0.05), 主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (P<0.05) 和鞘脂类代谢 (P<0.05)。T2D 与

AS 对比, 筛选出 49 个差异代谢物, T2D 组小鼠血清中 L-缬氨酸和乙酰乙酸水平显著升高 (P<0.001), 主要富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解通路 (P<0.05); AS 组小鼠血清中 L-谷氨酸、D-氨基葡萄糖 6-磷酸、N-乙酰甲酰谷氨酸和二甲基甘氨酸水平显著升高 (P<0.05), 主要富集在甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路 (P=0.12) (表 4)。

2.5 共性差异代谢物与血脂指标的关联分析

NAFLD、T2D 和 AS 病变常伴随着脂代谢紊乱, 故本文将共性代谢通路中的差异代谢物 (表 4) 与血脂指标关联分析, 探究共性差异代谢物与血脂的相关性。应用 RDA (见图 3A) 分析共性差异代谢物与

血脂的关系,RDA 的两个主坐标轴解释的比例分别为 82.51% 和 15.55%。TC、TG、LDL 之间呈正相关关系,与 HDL-C 呈负相关关系。结合相关性热图(见图 3B)综合分析可知,肌肽、葡萄糖酸内酯、7-磷酸景庚酮糖与 TC、TG 和 LDL-C 呈显著正相关($P<0.05$),与 HDL-C 呈显著负相关($P<0.05$);9-OxoODE、12,13-DHOME、13(S)-HODE、9,12,13-TriHOME、9,10-DHOME、15-脱氧-d-12,14-PGJ2、前列腺素 E2、亚油酸与 TC、TG 和 LDL-C 呈显著负相关($P<0.05$),与 HDL-C 呈显著正相关($P<0.05$),9(S)-HPODE 与 TC、TG 显著负相关($P<0.05$)。说明三种疾病的共性差异代谢物与血脂密切相关。

表 3 NAFLD、T2D 和 AS 个性差异代谢物及通路分析($n=10$)
Table 3 Analysis of metabolites and pathways of NAFLD, T2D and AS personality differences

分组 Groups	化合物名称 Compound names	对照组 Control group	疾病组 Diseases groups	通路 Pathways	类别 Categories
非酒精性 脂肪性肝病 NAFLD	D-鸟氨酸 D-ornithine	229 109 016± 50 919 869	257 284 504± 39 039 143	D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢 D-arginine and D-ornithine metabolism	蛋白质类 Proteins
	D-1-磷酸葡萄糖 D-1-glucose phosphate	2 868 643± 614 701	3 455 671± 912 330	半乳糖代谢 Galactose metabolism	
	蔗糖 Sucrose	23 165 783± 21 414 874	49 658 982± 20 148 725 ⁽¹⁾	半乳糖代谢 Galactose metabolism	
	山梨糖醇 Sorbitol powder	270 769 916± 174 800 580	901 085 741± 778 216 194 ⁽¹⁾	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	糖类 Glucides
2 型糖尿病 T2D	D-麦芽糖 D-maltose	1 246 676± 1 638 310	3 011 361± 2 979 993	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	
	鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	69 694 843± 56 225 093	18 986 773± 1 720 838 ⁽¹⁾	初级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis	类固醇类 Corticosteroids
	牛磺鹅去氧胆酸 Aurochenodeoxycholic acid	11 200 857± 13 275 146	1 975 025± 1 657 841		
	牛磺胆酸 Taurocholic acid	163 561 295± 199 920 363	32 920 618± 42 560 730		
动脉粥样硬化 AS	鞘氨醇 Sphingosine	331 776 289± 107 212 771	974 012 583± 306 719 231 ⁽⁴⁾		
	1-磷酸鞘氨醇 Sphingosine 1-phosphate	923 851 436± 223 051 370	1 038 532 989± 222 836 301 ⁽⁴⁾	鞘脂代谢 Sphingolipid metabolism	脂类 Lipids
	3-脱氢二氢鞘氨醇 3-dehydrodihydrosphingosine	25 506 000± 12 832 427	68 078 649± 10 726 405 ⁽⁴⁾		
	磷酸胞苷 CMP	5 808 785± 2 003 335	20 724 544± 9 274 110 ⁽²⁾		
	胞苷 Cytidine	130 835 342± 32 534 051	304 966 160± 34 553 842 ⁽⁴⁾	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	核酸 Nucleic acid
	胞嘧啶 Cytosine	327 818 309± 67 674 165	718 576 648± 108 513 368 ⁽⁴⁾		

注:与对照组对比, ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$, ⁽⁴⁾ $P<0.0001$ 。
Note. Compared with the normal group, ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$, ⁽⁴⁾ $P<0.0001$ 。

表 4 两种疾病间差异代谢物及代谢通路分析 (n=10)

Table 4 Analysis of differential metabolites and metabolic pathwaysbetween two diseases

分组 Groups	化合物名称 Compound names	对照组 Control group	疾病组 Diseases groups	通路 Pathways	类别 Categories
非酒精性脂肪性肝病 NAFLD	D-鸟氨酸	229 109 016±	257 284 504±	D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢	蛋白质类
	D-Ornithine	50 919 869	39 039 143	D-Arginine and D-ornithine metabolism	Proteins
	蔗糖	23 165 783±	49 658 982±	淀粉和蔗糖代谢	糖类
	Sucrose	21 414 875	20 148 725 ⁽¹⁾		
	D-麦芽糖	1 246 671±	3 011 361±		
	D-Maltose	1 638 310	2 979 993		
	海藻糖	3 932 521±	10 027 742±	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	蛋白质类
	Trehalose	1 616 322	3 394 864 ⁽⁴⁾		
	D-葡萄糖 1-磷酸	2 868 643±	3 455 672±		
	D-Glucose 1-phosphate	614 701	912 330		
非酒精性脂肪性肝病 NAFLD vs T2D	L-谷氨酰胺	28 535 410±	70 043 159±	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	蛋白质类
	L-Glutamine	10 015 193	59 433 397 ⁽¹⁾		
	氧代戊二酸	259 239 514±	428 607 931±		
	Oxoglutaric acid	112 681 537	158 705 128 ⁽¹⁾		
	乙酰乙酸	223 112 097±	383 622 204±	酮体的合成与降解	有机酸类
	Acetoacetic acid	50 543 081	61 000 307 ⁽⁴⁾		
	L-谷氨酸	623 855 914±	1 252 409 453±		
	L-Glutamic acid	154 640 359	152 114 542 ⁽⁴⁾		
	L-谷氨酰胺	58 239 471±	28 535 410±	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	蛋白质类
	L-Glutamine	18 754 769	10 015 193 ⁽²⁾		
非酒精性脂肪性肝病与动脉硬化 NAFLD vs AS	N-乙酰基 L-天冬氨酸	458 079 385±	29 936 363±		
	N-Acetyl-L-aspartic acid	101 716 752	14 902 054 ⁽⁴⁾		
	N-乙酰甲酰谷氨酸	12 021 625±	8 801 742±	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	糖类
	N-Acetylasparylglutamic acid	2 017 140	3 572 708 ⁽¹⁾		
	D-氨基葡萄糖 6-磷酸	10 534 590±	17 550 765±	鞘脂代谢	脂类
	D-Glucosamine 6-phosphate	4 614 480	3 744 614 ⁽²⁾		
	鞘氨醇	331 776 289±	974 012 583±		
	Sphingosine	107 212 771	306 719 231 ⁽⁴⁾		
	鞘氨酸	284 864 121±	922 054 680±	鞘脂代谢	有机酸类
	Sphinganine	98 047 406	289 639 966 ⁽⁴⁾		
2 型糖尿病 T2D	3-脱氢鞘氨酸	25 506 000±	68 078 648±		
	3-Dehydrosphinganine	12 832 427	10 726 405 ⁽⁴⁾		
	1-磷酸鞘氨酸	339 060 812±	486 297 682±	Valine, leucine and isoleucine degradation	有机氧化物类
	Sphinganine 1-phosphate	68 562 399	152 553 242 ⁽¹⁾		
	L-缬氨酸	104 235 777±	193 134 951±		
	L-Valine	64 875 602	57 310 824 ⁽³⁾		
	乙酰乙酸	223 112 097±	805 858 368±	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解	有机氧化物类
	Acetoacetic acid	50 543 081	260 863 005 ⁽⁴⁾		
	(S)-甲基丙二酸半醛	221 531 046±	342 621 290±		
	(S)-Methylmalonic acid semialdehyde	174 587 432	170 113 225		
2 型糖尿病与动脉硬化 T2D vs AS	氯乙酸	47 658 449±	80 296 899±	甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢	蛋白质类
	Ketoleucine	29 818 579	54 682 363		
	L-谷氨酸	623 855 914±	1 252 409 453±		
	L-Glutamic acid	154 640 359	152 114 542 ⁽⁴⁾		
	D-氨基葡萄糖 6-磷酸	10 534 590±	17 550 765±	Glycine, serine and threonine metabolism	糖类
	D-Glucosamine 6-phosphate	4 614 480	3 744 614 ⁽²⁾		
	N-乙酰甲酰谷氨酸	8 801 742±	12 021 625±		
	N-Acetylasparylglutamic acid	3 572 708	2 017 140 ⁽¹⁾		
	二甲基甘氨酸	59 097 853±	104 162 283±		有机酸类
	Dimethylglycine	16 142 134	16 249 173 ⁽⁴⁾		

注：与对照组对比，⁽¹⁾ P<0.05，⁽²⁾ P<0.01，⁽³⁾ P<0.001，⁽⁴⁾ P<0.0001。

Note. Compared with the normal group, ⁽¹⁾ P<0.05, ⁽²⁾ P<0.01, ⁽³⁾ P<0.001, ⁽⁴⁾ P<0.0001.

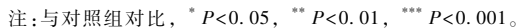


图 3 共同差异代谢物与血脂的 RDA 和相关性热图分析

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 RDA and correlation thermal analysis of common differential metabolites and blood lipids

鉴于临床样本来源复杂,个体化差异大,实验分析结果因年龄、生活嗜好、用药状况和并发症等影响因素可能出现偏差,且 NAFLD、T2D 和 AS 三种疾病动物模型构建已成体系^[10-12],故本实验优先考虑使用动物血清样本来探究糖脂代谢性疾病的代谢谱特征。

与现有的文献报道趋势一致^[18-20]。另外,我们通过血清代谢组学分析发现,NAFLD、T2D 和 AS 组拥有 48 个相同的差异代谢物,大部分为脂类,其他还有蛋白质类、糖类、维生素和辅助因子等,这些代谢物主要富集在亚油酸代谢、磷酸戊糖代谢、花生四烯酸代谢和组氨酸代谢通路等。进一步将 48 个差异代谢物与血脂指标关联分析,发现差异代谢物与血脂具有显著相关性,表明三种疾病均与血脂异常密切相关,上述相同的差异代谢物和代谢通路为其共性预防和治疗提供依据。

LA 和 AA 为常见的膳食脂肪酸,在 NAFLD、T2D 和 AS 的发生和发展中起关键作用。我们的研究发现,与对照组相比,三种疾病模型小鼠血清中 LA 及其中间代谢物如 9-OxoODE、9(S)-HPODE、9,10-EpOME、12,13-DHOME、13(S)-HODE、9,12,13-TriHOME 和 9,10-DHOME 水平均降低。研究表明,亚油酸可以通过抑制胰脂肪酶来减少膳食脂肪的消化和吸收^[21],通过食品或药品补充共轭亚油酸可以降低血清 TG 和胆固醇水平,减少肝脂质堆积,提高糖耐量,改善 T2D、NAFLD 和 AS 等慢性代谢性疾病^[22]。AA 可在环氧合酶、脂氧合酶和细胞色素 P450 酶系作用下转化为前列素 E2(PGE2)、白三烯

B4(LTB4)和血栓素 A2(TXA2)。本研究还发现三种疾病小鼠血清中 AA 和 PGE2 水平均升高。有研究报道桑叶水提取物^[23]和吴茱萸汤^[24]可以通过调节花生四烯酸代谢通路改善 NAFLD、T2D 和 AS 的脂质代谢紊乱。由此推测,LA 及其中间代谢物水平降低和 AA 及代谢物水平升高可能是三种疾病的危险因素。

磷酸戊糖途径是葡萄糖氧化分解的主要途径,有研究表明炎症会增加葡萄糖的利用,升高磷酸戊糖代谢水平^[25]。抑制磷酸戊糖途径可减轻炎症,减少肝脂质沉积,改善血脂异常^[26]。我们研究发现,与对照组相比,葡萄糖酸内酯和 7-磷酸景庚酮糖水平均升高,故推测磷酸戊糖代谢水平升高可进一步加重三种疾病血脂异常和炎症反应。

组氨酸代谢通路也是三种疾病模型的共性通路之一,肌肽为该通路中的共同差异代谢物,而 L-组氨酸是肌肽主要活性成分^[27],二者主要来源为食物。补充肌肽或组氨酸均可降低血糖和血脂水平以及改善 IR、炎症、氧化应激^[28-29]。但在本研究中,与对照组相比,三种疾病小鼠血清肌肽均升高,我们推测高脂饮食可能是导致肌肽升高的主要原因。

NAFLD、T2D 与 AS 发病机制复杂,临床上往往多病并发,关注这些糖脂代谢性疾病共性特征的同时,也要重视上述疾病的个性特征。故我们进一步分析了三种疾病的个性差异代谢物和代谢通路。

通过与 T2D 组比较,我们发现 NAFLD 组的主要个性代谢通路为 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢,这也与三组间比较的结果一致。精氨酸是一种必需氨基酸,在精氨酸酶的作用下代谢为鸟氨酸和尿素^[30]。临床研究表明,NAFLD 患者血浆中精氨酸水平降低和鸟氨酸水平升高与纤维化程度相关^[31-32]。给予口服精氨酸补充剂可减少脂质沉积、降低血糖和炎症反应以及减缓 NAFLD 向非酒精性脂肪性肝炎进展^[33]。而与 AS 组相比,NAFLD 组个性差异代谢物主要富集在酮体的合成与降解通路。肝可以将葡萄糖转化为脂肪酸,后者可在线粒体内氧化分解为酮体,而我们筛选出的差异代谢物乙酰乙酸为酮体的组成之一。研究表明,循环内高水平酮体与 NAFLD 患者死亡率升高密切相关^[34],我们的研究结果显示 NAFLD 组小鼠血清中乙酰乙酸水平显著升高,故我们推测 NAFLD 组小鼠存在酮体高水平现象,为临床治疗提供线索。

同样,我们也探究了 T2D 的代谢谱特征。与 NAFLD 组相比,我们发现除了淀粉与蔗糖代谢途径,T2D 组小鼠血清代谢物主要还富集在 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路。与 AS 组相比,T2D 组小鼠血清代谢物主要富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢通路。众所周知,胰岛素具有促进蛋白质合成和抑制蛋白质分解的功能,IR 与血清高氨基酸血症相关,极性氨基酸(如谷氨酰胺和谷氨酸)和支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)水平均为预测 T2D 的重要风险因素^[35-36],其中极性氨基酸水平与胰岛素敏感性呈负相关,与胰岛素分泌呈正相关。我们的研究结果显示 T2D 组小鼠血清中 L-谷氨酰胺、氧代戊二酸(谷氨酸代谢物)、L-缬氨酸水平均显著上调,这与现有研究吻合,可见氨基酸代谢与 T2D 关系密切。而在三组间相比中我们发现 T2D 的主要个性代谢通路为半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢和初级胆汁酸生物合成。人体 70% 的能量来源于糖,故糖代谢是调控机体能量生成的重要代谢途径。本研究发现,T2D 组小鼠血清中蔗糖、山梨糖醇、D-1-磷酸葡萄糖和 D-麦芽糖水平均上调,其中蔗糖和山梨糖醇水平显著升高。蔗糖和麦芽糖均来源于食物,蔗糖可在蔗糖酶的作用下分解为果糖和葡萄糖。胰岛 β 细胞受损,胰岛素分泌不足,机体处于高血糖状态,此时细胞内葡萄糖倾向于转化为山梨糖醇^[37]。此外,高血糖会增加葡萄糖氧化速率,使 D-1-磷酸葡萄糖水平升高^[38]。可见半乳糖代谢和淀粉和蔗糖代谢失调为 T2D 的危险因素。同时,初级胆汁酸生物合成与 T2D 密切相关。胆汁酸为胆固醇在肝中的主要代谢物,可参与葡萄糖代谢和能量代谢。在本研究中,与对照组相比,T2D 组小鼠血清中鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺胆酸均显著降低。有临床报道 IR 和高血糖会增加胆汁酸的合成以及改变胆汁酸的组成^[39]。但 T2D 疾病与血清胆汁酸异常研究少,尚无定论,具有较大研究潜力。

最后,我们分析了 AS 的主要个性代谢物及其富集的代谢通路。与 NAFLD 组相比,AS 组小鼠差异代谢物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路。与 T2D 组相比,AS 组小鼠差异代谢物主要富集在甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路。AS 组小鼠血清中 L-谷氨酸、L-谷氨酰胺及其中间代谢产物水平显著降低,二甲基甘氨酸水平显著升高。现有的研究表明,膳食补充 L-天冬氨酸和 L-谷氨酸可

有效抑制 AS 的发展^[40]。吴茱萸汤可以通过调节鞘脂代谢和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路,抑制平滑肌细胞增殖来发挥缓解 AS 的作用^[24],可见调节氨基酸代谢可以改善 AS。通过三组相比,我们发现 AS 的主要代谢通路为鞘脂代谢和嘧啶代谢。鞘脂是哺乳动物细胞膜主要成分,其代谢物鞘氨醇可在鞘氨醇激酶的作用下形成 1-磷酸鞘氨醇(S1P),S1P 可与 G 蛋白偶联受体(S1PR1-3)结合,对 AS 具有双向调节作用^[41]。该研究中,AS 组小鼠血清中鞘氨醇和 S1P 显著升高,故我们推测 S1P 主要与 S1PR2 结合发挥促 AS 作用^[42]。嘧啶是一种与 AS 发生、发展密切相关的含氮化合物,饮食中添加 DNA 或 RNA 可增加血管脂质沉积,加重 AS^[43]。在本研究中,我们也发现 AS 组胞嘧啶、胞苷等显著升高,说明嘧啶代谢失调为 AS 重要危险因素,值得进一步深入研究。

4 总结与展望

NAFLD、T2D 和 AS 三种疾病发生和发展过程既有共性,又有特性,本研究分别构建 NAFLD、T2D 和 AS 小鼠模型,利用 UPLC-MS 技术分析其血清代谢谱特征,综合分析三种疾病的共性和个性代谢物及代谢通路,并将共性代谢物与血脂指标关联,探讨共性代谢物与血脂的关系,并结合文献报道,分析其潜在生物学意义和临床价值,为研究糖脂代谢性疾病相关靶点及药物提供线索,为临床个性与共性治疗提供实验基础。遗憾的是,本研究样本量虽符合统计学意义,但样本量不够大,且未对发现的重要代谢物和代谢通路进行验证,后续扩大样本量,增加实验验证或者结合临床样本可能会使我们的研究更具说服力和转化意义。

参考文献:

- [1] Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, et al. The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 3920196.
- [2] Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. J Hepatol, 2019, 71(4): 793-801.
- [3] Targher G, Corey KE, Byrne CD, et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus-mechanisms and treatments [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(9): 599-612.
- [4] Athyros VG, Doumas M, Imprialos KP, et al. Diabetes and lipid metabolism [J]. Hormones, 2018, 17(1): 61-67.
- [5] Krishan S. Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dyslipidemia in type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab Syndr, 2016, 10(2 Suppl 1): S77-S81.
- [6] Chiang CH, Huang PH, Chung FP, et al. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31799.
- [7] Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications [J]. J Hepatol, 2016, 65(2): 425-443.
- [8] 郭姣, 肖雪, 荣向路, 等. 糖脂代谢病与精准医学 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(1): 50-54.
- [9] Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, et al. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 190: 113509.
- [10] 钱伯初, 史红, 吕燕萍. 非酒精性脂肪肝与脂肪性肝炎动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(7): 426-430.
- [11] 冷昌龙, 皮明山, 龚晓康. 单次大剂量对比多次小剂量 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 113-118.
- [12] 全文娟, 廖端芳, 庾勤慧. 动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 147-150.
- [13] 庞会婷. 中药田黄方通过肠道菌群改善 NAFLD 的作用及机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [14] 王乐琪. 炎症介质特征谱的构建及在 2 型糖尿病和高脂血症中应用 [D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [15] 罗朵生, 孙玲, 陈可纯, 等. 田黄方抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用及机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(4): 465-469.
- [16] Caussy C, Aubin A, Loomba R. The relationship between type 2 diabetes, NAFLD, and cardiovascular risk [J]. Curr Diab Rep, 2021, 21(5): 15.
- [17] 李双双. TG/HDL-C 比值与非酒精性脂肪性肝病的关系研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [18] 程龙, 董世芬, 袁悦莹, 等. 大黄素对 ApoE 基因敲除小鼠脂肪棕色化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 8-14.
- [19] 苑慈敏. 大豆异黄酮对 2 型糖尿病模型小鼠脂代谢及炎症因子的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [20] 郑旭. 丹参酮 II A 对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病的改善作用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [21] Li X, Morita S, Yamada H, et al. Free linoleic acid and oleic acid reduce fat digestion and absorption *in vivo* as potent pancreatic lipase inhibitors derived from sesame meal [J]. Molecules, 2022, 27(15): 4910.
- [22] 李灵杰. 共轭亚油酸改善肥胖糖尿病小鼠脂代谢的作用及其分子机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [23] 赵燕琳, 许冰菊, 陆东裕, 等. 桑叶水提取物对 2 型糖尿病小

- 鼠花生四烯酸代谢通路的影响 [J]. 药学报, 2021, 56(10): 2809-2816.
- [24] Li C, Chi C, Li W, et al. An integrated approach for identifying the efficacy and potential mechanisms of TCM against atherosclerosis-Wu-Zhu-Yu decoction as a case study [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 296: 115436.
- [25] Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86426.
- [26] Huang ZR, Deng JC, Li QY, et al. Protective mechanism of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench.) against nonalcoholic fatty liver disease associated with dyslipidemia in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(24): 6530-6543.
- [27] Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine [J]. Physiol Rev, 2013, 93(4): 1803-1845.
- [28] Holecek M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 848.
- [29] Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health [J]. Amino Acids, 2020, 52(3): 329-360.
- [30] Langner M, Mateska I, Bechmann N, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry based quantification of arginine metabolites including polyamines in different sample matrices [J]. J Chromatogr A, 2022, 1671: 463021.
- [31] Ajaz S, McPhail MJ, Gnudi L, et al. Mitochondrial dysfunction as a mechanistic biomarker in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Mitochondrion, 2021, 57: 119-130.
- [32] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, et al. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14205-14218.
- [33] Sellmann C, Degen C, Jin CJ, et al. Oral arginine supplementation protects female mice from the onset of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Amino Acids, 2017, 49(7): 1215-1225.
- [34] Post A, Garcia E, van den Berg EH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, circulating ketone bodies and all-cause mortality in a general population-based cohort [J]. Eur J Clin Invest, 2021, 51(12): e13627.
- [35] Owei I, Umekwe N, Stentz F, et al. Amino acid signature predictive of incident prediabetes: a case-control study nested within the longitudinal pathobiology of prediabetes in a biracial cohort [J]. Metabolism, 2019, 98: 76-83.
- [36] Ramzan I, Ardavani A, Vanweert F, et al. The association between circulating branched chain amino acids and the temporal risk of developing type 2 diabetes mellitus: a systematic review & meta-analysis [J]. Nutrients, 2022, 14(20): 4411.
- [37] Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications [J]. N Engl J Med, 1987, 316(10): 599-606.
- [38] Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, et al. Liver glucose metabolism in humans [J]. Biosci Rep, 2016, 36(6): e00416.
- [39] Mantovani A, Dalbeni A, Peserico D, et al. Plasma bile acid profile in patients with and without type 2 diabetes [J]. Metabolites, 2021, 11(7): 453.
- [40] Yanni AE, Agrogiannis G, Nomikos T, et al. Oral supplementation with L-aspartate and L-glutamate inhibits atherogenesis and fatty liver disease in cholesterol-fed rabbit [J]. Amino Acids, 2010, 38(5): 1323-1331.
- [41] Jozefczuk E, Guzik TJ, Siedlinski M. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology [J]. Pharmacol Res, 2020, 156: 104793.
- [42] Zhao J, Garcia D, Gartung A, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype 2 signaling in endothelial senescence-associated functional impairments and inflammation [J]. Curr Atheroscler Rep, 2015, 17(5): 504.
- [43] Fillios LC, Naito C, Andrus SB, et al. The hypercholesteremic and atherogenic properties of various purines and pyrimidines [J]. Am J Clin Nutr, 1959, 7(1): 70-75.

[收稿日期]2022-09-30