

赵梅玉,史欣悦,周姝伶,等. 非酒精性脂肪性肝病大鼠的血清溶血磷脂酰胆碱和氨基酸代谢轮廓研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 477-484.

ZHAO M Y, SHI X Y, ZHOU S L, et al. Metabolic profiles of serum lysophosphatidylcholine and amino acids in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 477-484.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.008

非酒精性脂肪性肝病大鼠的血清溶血磷脂酰胆碱和氨基酸代谢轮廓研究

赵梅玉,史欣悦,周姝伶,李海军,樊淑婷,熊印华*

(江西科技师范大学药学院,南昌 330013)

【摘要】 目的 利用代谢组学手段研究非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠血清的氨基酸和溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)代谢轮廓,寻找可表征 NAFLD 的生物标志物并推测其发生的可能机制。**方法** 通过喂养高脂饮食饲料和腹腔注射 CCl_4 制备 NAFLD 大鼠,采用液相色谱-质谱联用技术测定对照组和 NAFLD 组的大鼠血清中 15 种 LPCs 和 18 种氨基酸的含量;采用主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析等方法分析大鼠 NAFLD 肝损伤后血清中 LPC 和氨基酸代谢轮廓的变化,运用 Pearson 相关分析方法分析生物标志物与 NAFLD 的相关性。**结果** NAFLD 组的大鼠血清 LPC 和氨基酸代谢轮廓明显偏离对照组,且能完全区分开;LPC(20:1)、精氨酸和谷氨酸对 NAFLD 有显著贡献,这 3 个代谢物被鉴定为生物标志物;LPC(20:1)和精氨酸与 AST、ALT、LDL、TBIL 等血清生化指标显著相关。**结论** 血清溶血磷脂酰胆碱和氨基酸的代谢轮廓与 NAFLD 密切相关。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病;溶血磷脂酰胆碱;氨基酸;代谢轮廓

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0477-08

Metabolic profiles of serum lysophosphatidylcholine and amino acids in rats with nonalcoholic fatty liver disease

ZHAO Meiyu, SHI Xinyue, ZHOU Shuling, LI Haijun, FAN Shuting, XIONG Yinhua*

(School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Corresponding author: XIONG Yinhua. E-mail: xiongyhfriend@126.com

【Abstract】 Objective To use metabolomics method to study the metabolic profiles of amino acids and lysophosphatidylcholine (LPC) in the serum of rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), to identify biomarkers for NAFLD, and to speculate on the possible mechanism responsible for its occurrence. **Methods** NAFLD rats were prepared by feeding a high-fat diet and intraperitoneal injection of carbon tetrachloride. Levels of 15 LPCs and 18 amino acids in the serum were determined in control and NAFLD rats by liquid chromatography-mass spectrometry. Changes in serum LPC and amino acid metabolic profiles in NAFLD rats were analyzed by principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. Correlations between biomarkers and NAFLD were analyzed by Pearson's

【基金项目】 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2201313),江西省高等学校精细化学品工程技术研究中心开放课题(JFCEC-KF-2202),大学生创新创业训练计划项目(20231704202),研究生创新专项资金项目(YC2023-S910)。

Funded by the Science and Technology Research Project of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ2201313), Open Project of Fine Chemical Engineering Technology Research Center of Jiangxi University (JFCEC-KF-2202), Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (20231704202), Graduate Student Innovation Special Fund Project (YC2023-S910).

【作者简介】 赵梅玉,女,硕士,研究方向:代谢组学和中药药理。Email:1511875354@qq.com

【通信作者】 熊印华,男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:代谢组学和药物毒性。Email:xiongyhfriend@126.com

correlation analysis. **Results** The metabolic profiles of serum LPC and amino acids differed significantly between the NAFLD group and the control group and were completely distinct. LPC (20 : 1), arginine, and glutamic acid had significant contributions to NAFLD and were identified as biomarkers. Furthermore, LPC (20 : 1) and arginine were significantly correlated with serum biochemical indicators such as aspartate transaminase, alanine transaminase, low-density lipoprotein, and total bilirubin. **Conclusions** The metabolic profiles of serum LPC and amino acids may be closely related to NAFLD.

【**Keywords**】 nonalcoholic fatty liver disease; lysophosphatidylcholine; amino acids; metabolic profile

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

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种影响全球 25% 人口的代谢性慢性肝病^[1], 严重威胁着人们的身体健康。NAFLD 可进一步发展为肝纤维化、肝硬化和肝癌, 重症肝病治疗棘手, 早期诊断和治疗显得尤其重要。肝是内源性代谢物溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC)、氨基酸合成和代谢的主要场所, 肝损伤必然会引起机体内 LPC、氨基酸的水平和代谢轮廓的变化^[2-5]。有研究表明, LPC 通过与 G 蛋白偶联受体和 Toll 样受体结合而发挥作用; 通过结合 TLR2 和 TLR4 受体激活 NF- κ B、p38MAPK 等信号通路, 调控促炎细胞因子水平, 诱导氧化应激, 促进肝炎症的发展^[6-8]。甘氨酸抑制 Kupffer 细胞活化可降低促炎和促纤维化细胞因子水平, 进而抑制肝纤维化进展^[9-10]。酪氨酸代谢紊乱可抑制小鼠体内 Sp1/Tfr2/Hepcidin 信号通路, 导致 Fe³⁺ 过量积蓄, 增加细胞内活性氧自由基, 诱导小鼠肝损伤^[11-13]。

综上, NAFLD 与 LPC 和氨基酸代谢异常存在相关性。本研究在高脂饮食饲料 (high-fat diet, HFD) 和 CCl₄ 诱导 NAFLD 大鼠的药理实验基础上, 用液相-质谱联用技术测定大鼠血清中 LPCs 和氨基酸的含量, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等方法研究 NAFLD 肝损伤大鼠中血清 LPC 和氨基酸代谢轮廓的变化, 探究 LPC 和氨基酸代谢与 NAFLD 相关性, 为 NAFLD 的诊断和防治提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

16 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体重约为 200 g, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司【SCXK

(京)2019-0010】。12 h 循环照明, 室温 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度 60% ~ 70%, 大鼠自由饮食进水, 饲养于南昌大学动物房【SYXK (赣)2021-0004】。研究方案经江西科技师范大学动物伦理委员会批准 (Y202202), 所有动物均按照美国国立卫生研究院的《实验动物护理和使用指南》进行处理。

1.1.2 主要试剂与仪器

赖氨酸 (Lysine)、缬氨酸 (Valine)、丝氨酸 (Serine)、甲硫氨酸 (Methionine)、异亮氨酸 (Isoleucine)、脯氨酸 (Proline)、苏氨酸 (Threonine)、半胱氨酸 (Cysteine)、苯丙氨酸 (Phenylalanine)、亮氨酸 (Leucine)、色氨酸 (Tryptophan)、酪氨酸 (Tyrosine)、谷氨酸 (Glutamic acid)、谷氨酰胺 (Glutamine)、组氨酸 (Histidine)、精氨酸 (Arginine)、天冬酰胺 (Asparagine)、天门冬氨酸 (Aspartic acid) 均购于北京百灵威科技有限公司; LPC (14 : 0)、LPC (16 : 0)、LPC (17 : 0)、LPC (18 : 1)、LPC (19 : 0) 和 LPC (20 : 0) 购于美国 Avanti Polar Lipids 公司; HFD 购于上海普路腾生物科技有限公司, 配方 (质量分数): 繁殖鼠料 82.5%、猪油 10%、胆酸钠 0.5%、胆固醇 2%、蛋黄粉 5%; 质谱级甲醇、乙腈和甲酸购于德国 Merck 公司; 分析纯甲醇、乙腈、氯仿和 CCl₄ 购于西陇科技股份有限公司。

ACQUITY UPLC Class-I 串联 Vexo G2-XS Q-ToF (Waters 公司, 美国), 7080 型全自动生化分析仪 (Hitachi 公司, 日本), TGL-16 型高速冷冻离心机 (湖南湘仪, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理

16 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d, 按体重随机分为对照组和 NAFLD 组。对照组喂食基础标准饲料 8 周; NAFLD 组喂食 HFD 8 周, 第 8 周腹腔注射 1 次 CCl₄ 玉米油溶液 (0.4 mL CCl₄/kg)。给予 CCl₄ 48 h 后, 用低浓度异氟烷麻醉大鼠, 眼眶取血采集全血, 用高浓度异氟烷处死大鼠摘取肝组织。

1.2.2 血清生化指标测定

全血静置 2 h, 离心 (3500 r/min, 4 °C) 10 min, 上层血清 -80 °C 保存, 按生化试剂盒说明书规定的方法测定谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 活性, 总胆固醇 (T-CHO)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和总胆红素 (TBIL) 的含量。

1.2.3 肝组织病理分析

肝组织用生理盐水冲洗, 1 cm × 1 cm 肝组织用 4% 多聚甲醛组织液固定, 经 70% 乙醇脱水、石蜡包埋和苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色等步骤制成 HE 肝切片。

1.2.4 LPCs 含量测定

液相-质谱条件: Waters UPLC HSS T3 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) 和甲醇 (B), 梯度洗脱; ESI (+), MRM 模式; 毛细管电压为 3.0 kV, 锥孔电压为 35.0 V。标准曲线的建立: 取 LPC (14 : 0)、LPC (16 : 0)、LPC (17 : 0)、LPC (18 : 1) 和 LPC (20 : 0) 对照品, 用甲醇-氯仿 (1 : 1) 配制质量浓度为 2 mg/mL 的 LPCs 混合标准品溶液, 用 1% 牛血清白蛋白作为模拟血清制备成质量浓度为 0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1、2.5、5 和 10 μg/mL 共 9 种标准曲线校正溶液, 以 LPCs 浓度为横坐标, LPCs 与内标响应值的比值为纵坐标, 绘制 5 种 LPCs 的标准曲线, 计算回归方程。血清样品制备: 取血清 20 μL, 加入 20 μL 内标溶液 (100 μg/mL), 再加入 160 μL 甲醇-氯仿 (1 : 1), 离心 10 min (4 °C, 12 000 r/min), 取上清液 40 μL, 用甲醇-乙腈 (3 : 1) 溶剂稀释至 800 μL, 即得供试溶液。样品测定: 取 2 μL 供试溶液注入液相-质谱联用仪, 采集 LPCs 和内标峰面积, 按随行标准曲线计算血清中 15 种 LPCs 的含量。

1.2.5 氨基酸含量测定

液相-质谱条件: Waters BEH Amide 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) 和 0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱; ESI (+), MRM 模式; 毛细管电压为 2 kV, 锥孔电压为 40 V。标准曲线的建立: 取 18 种氨基酸对照品适量, 用 50% 甲酸或水配制质量浓度为 280 μg/mL 的氨基酸混合标准品溶液, 用 1% 牛血清白蛋白作为模拟血清制备成质量浓度为 280、140、70、40、25、20、10、4 和 2 μg/mL 的标准曲线校正溶液, 以氨基酸浓度为横坐标, 氨基酸与内标响应值的比值为纵坐标, 绘制

18 种氨基酸的标准曲线, 计算回归方程。血清样品制备: 取 20 μL 血清, 加入 20 μL 内标溶液, 再加入 360 μL 乙腈-水 (7 : 3), 离心 10 min (4 °C, 15 000 r/min), 取 100 μL 上清液, 用乙腈-水 (7 : 3) 稀释至 500 μL, 即得供试溶液。样品测定: 取 2 μL 供试溶液注入液相-质谱联用仪, 采集氨基酸和内标峰面积, 按随行标准曲线计算血清中 18 种氨基酸的含量。

1.3 统计学分析

生化指标和代谢物含量数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; Simca-P 14.1 软件做 PCA 和 OPLS-DA; SPSS 26.0 软件做 *T* 检验和 Pearson 相关分析, *P* < 0.05 表示具有统计学意义。

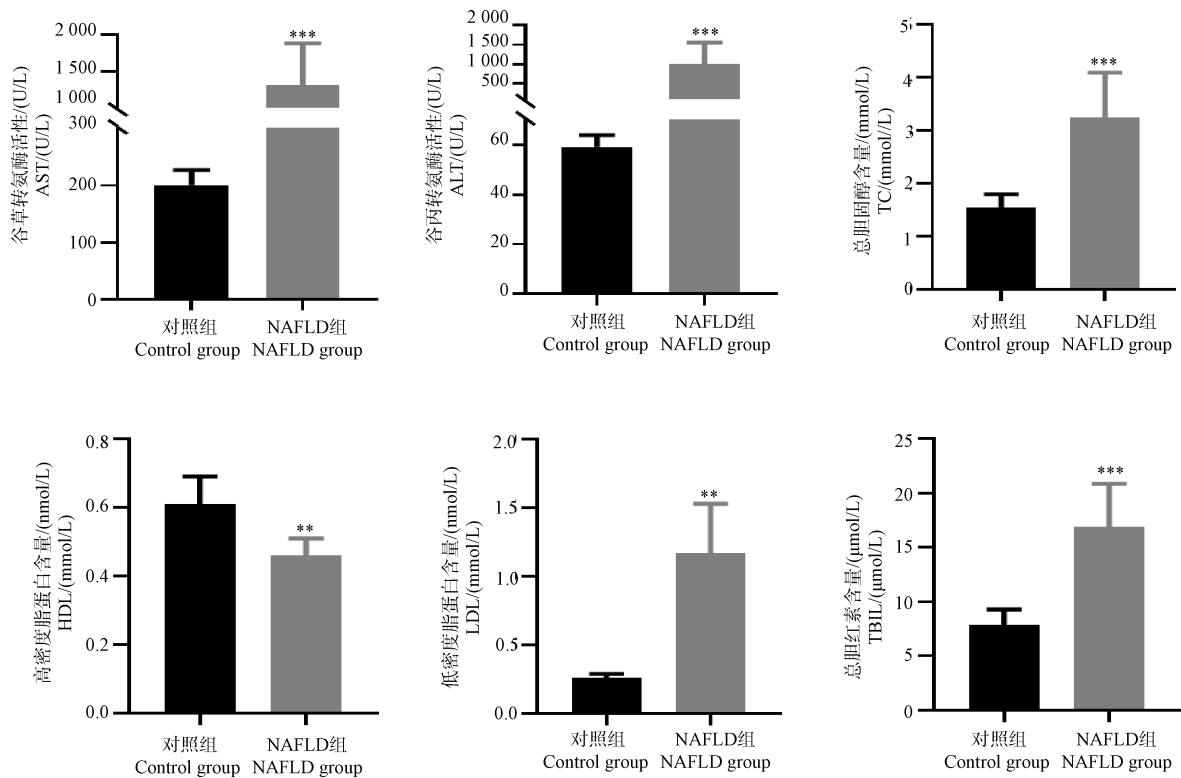
2 结果

2.1 NAFLD 大鼠的血清生化指标和肝组织病理分析

本实验采用 AST、ALT、TC、HDL、LDL、TBIL 等生化指标和 HE 肝病理切片评价 NAFLD。如图 1 所示, 与对照组相比, NAFLD 组 AST、ALT 的活性显著提高 (*P* < 0.001), TC、LDL 和 TBIL 的含量均显著升高 (*P* < 0.01, *P* < 0.001), 且 AST 和 ALT 的活性分别升高了约 6.5 倍和 19 倍, 而 HDL 的含量显著降低 (*P* < 0.01)。肝组织病理结果显示 (图 2), 对照组肝切片结构正常, 无异常形态学改变, NAFLD 组肝细胞发生明显脂肪变性; 肝细胞肿大变圆, 胞浆疏松, 肝小叶中央静脉周围肝细胞呈典型“脂大泡”样变。生化指标和肝病理切片结果表明 NAFLD 大鼠造模成功。

2.2 NAFLD 大鼠的血清 LPCs 和氨基酸的含量

按参考文献^[2]方法测定大鼠血清中 LPCs 的含量, 该方法中对没有对照品的 LPCs 选用碳原子数相近的 LPC 标准曲线定量; 氨基酸采用相对应的氨基酸标准曲线定量。NAFLD 组的大鼠的血清中 15 种 LPCs 和 18 种氨基酸的含量变化见表 1、表 2。整体上 NAFLD 组 LPCs 的含量有下降的趋势, 而氨基酸的含量有升高的趋势。与对照组比较, NAFLD 组的 LPC (16 : 0)、LPC (16 : 1)、LPC (17 : 1)、LPC (18 : 0)、LPC (18 : 1)、LPC (20 : 1) 和 LPC (20 : 3) 的含量显著降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 其中 LPC (18 : 1)、LPC (20 : 1) 含量减少 3 倍以上; NAFLD 组谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺和半胱氨酸的含量显著升高 (*P* < 0.05), 其中半胱氨酸升高约 6 倍; 精



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下表同)

图 1 大鼠血清生化指标测定结果

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

Figure 1 Serum biochemical indexes of rats

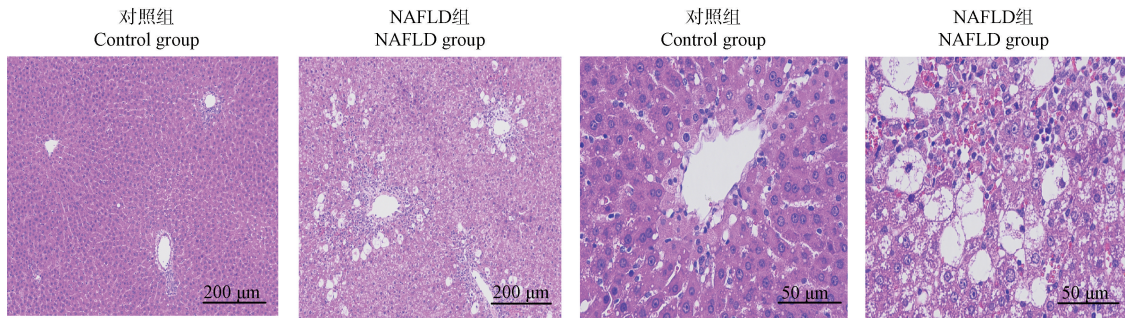


图 2 肝组织病理切片结果

Figure 2 Pathological section results of liver tissue

氨酸含量显著降低($P < 0.001$),精氨酸减少 28 倍以上。

2.3 通路分析

将含量具有显著性差异的氨基酸(见表 2)导入到 MetPA(<http://www.metaboanalyst.ca/>)进行通路分析,如图 3 所示,4 个代谢通路的 impact 值 > 0.1 和 $-\log P > 2$,包括 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸生物合成,精氨酸和脯氨酸代谢,均与 HFD 和 CCl_4 诱导的

NAFLD 密切相关。

2.4 多变量统计分析

2.4.1 PCA

以 LPCs 的浓度与所有样本 LPCs 平均浓度比值的校正值为 X 变量,对照组和 NAFLD 组 16 个样本进行两主成分的 PCA 分析($R^2X = 0.59$)。如 PCA 散点图(图 4A)所示,对照组样本离散度较高,但对照组和 NAFLD 组的样本能完全区分。同理,以氨基酸的校正值为 X 变量,对这两组 16 个样本做

表 1 NAFLD 对大鼠血清 LPC 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of NAFLD on serum LPC contents in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

溶血磷脂酰胆碱 LPCs	对照组 Control group	NAFLD 组 NAFLD group
溶血磷脂酰胆碱(14:0) LPC(14:0)	5.83 ± 11.53	24.64 ± 15.33
溶血磷脂酰胆碱(16:0) LPC(16:0)	1003.51 ± 392.39	511.84 ± 133.25 **
溶血磷脂酰胆碱(16:1) LPC(16:1)	831.65 ± 296.03	474.21 ± 134.33 **
溶血磷脂酰胆碱(17:0) LPC(17:0)	86.01 ± 20.12	133.45 ± 75.24
溶血磷脂酰胆碱(17:1) LPC(17:1)	179.71 ± 58.97	102.13 ± 39.83 *
溶血磷脂酰胆碱(18:0) LPC(18:0)	1206.34 ± 631.40	472.01 ± 90.77 **
溶血磷脂酰胆碱(18:1) LPC(18:1)	1686.04 ± 1219.84	463.47 ± 220.44 **
溶血磷脂酰胆碱(18:2) LPC(18:2)	497.64 ± 218.25	333.27 ± 135.04
溶血磷脂酰胆碱(18:3) LPC(18:3)	679.83 ± 301.14	518.75 ± 86.95
溶血磷脂酰胆碱(20:1) LPC(20:1)	1947.73 ± 1194.93	325.94 ± 155.60 **
溶血磷脂酰胆碱(20:3) LPC(20:3)	926.85 ± 474.78	430.53 ± 173.21 *
溶血磷脂酰胆碱(20:4) LPC(20:4)	1215.54 ± 599.45	830.52 ± 236.57
溶血磷脂酰胆碱(20:5) LPC(20:5)	217.56 ± 188.48	125.19 ± 37.38
溶血磷脂酰胆碱(22:5) LPC(22:5)	114.71 ± 43.10	90.00 ± 16.72
溶血磷脂酰胆碱(22:6) LPC(22:6)	164.34 ± 79.43	109.84 ± 21.26

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 2 NAFLD 对大鼠血清氨基酸含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of NAFLD on serum amino acid contents in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

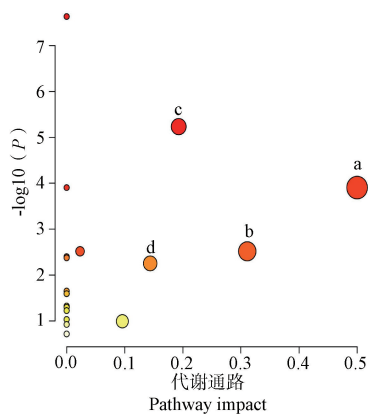
氨基酸 Amino acids	对照组 Control group	NAFLD 组 NAFLD group
异亮氨酸 Isoleucine	76.10 ± 40.63	129.46 ± 34.07
亮氨酸 Leucine	21.15 ± 1.78	25.75 ± 4.51
色氨酸 Tryptophan	45.86 ± 2.74	49.39 ± 9.30
苯丙氨酸 Phenylalanine	37.43 ± 8.05	25.66 ± 6.54
甲硫氨酸 Methionine	58.55 ± 33.02	85.30 ± 51.55
缬氨酸 Valine	23.31 ± 21.10	63.38 ± 26.33
酪氨酸 Tyrosine	123.26 ± 74.39	200.12 ± 83.74
脯氨酸 Proline	80.26 ± 26.65	174.14 ± 105.59
谷氨酸 Glutamic acid	169.69 ± 47.16	513.67 ± 265.56 *
苏氨酸 Threonine	260.59 ± 108.37	400.41 ± 125.15 *
天门冬氨酸 Aspartic acid	562.88 ± 726.29	89.21 ± 57.24
谷氨酰胺 Glutamine	991.38 ± 300.53	1997.20 ± 401.28 *
丝氨酸 Serine	316.98 ± 115.75	493.11 ± 110.14
天冬酰胺 Asparagine	197.89 ± 73.65	97.49 ± 38.28
精氨酸 Arginine	2810.25 ± 1019.98	98.57 ± 80.11 ***
组氨酸 Histidine	247.59 ± 62.99	176.52 ± 48.94
赖氨酸 Lysine	1168.20 ± 307.22	1675.92 ± 357.49
半胱氨酸 Cysteine	40.84 ± 28.51	248.41 ± 94.90 *

两主成分 PCA 分析($R^2X = 0.584$),如 PCA 散点图(图 4B)所示,对照组和 NAFLD 组的样本也能完全区分。上述结果提示大鼠 NAFLD 肝损伤后血清中 LPC 和氨基酸的代谢轮廓均发生明显的变化。

2.4.2 OPLS-DA

为发现能表征 NAFLD 的生物标识物,对照组和 NAFLD 组分别进行 OPLS-DA 建模。以 LPCs 的校正值为 X 变量,组别为 Y 变量,建立第一个 OPLS-DA 模型。该模型的 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.564、0.954 和 0.860,表明具有较好的解释能力和预测能力,散点图见图 5A;对该模型进行 200 次迭代置换

检验,每次置换后模型的 R^2 和 Q^2 均低于原始值,且 Q^2 的回归截距小于 0,表明该模型未过度拟合,见图 5B。如图 5C 所示,LPC(20 : 1)、LPC(18 : 1)和 LPC(14 : 0)的 VIP 值大于 1,LPC(20 : 1)和 LPC(18 : 1)的含量在两组间具有显著性差异,但 LPC(18 : 1)的偏差超过了正常范围。因此,LPC(20 : 1)被鉴定为能表征 NAFLD 的 LPC 类生物标志物。同理,以氨基酸校正值为 X 变量,组别为 Y 变量,建立第 2 个 OPLS-DA 模型。如图 6 所示,该模型($R^2X = 0.556$, $R^2Y = 0.991$, $Q^2 = 0.997$)也未过度拟合;精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、和天冬酰



注:a:D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢;b:丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;c:精氨酸生物合成;d:精氨酸和脯氨酸代谢。

图 3 与 NAFLD 模型相关的氨基酸代谢通路

Note. a. D-glutamine and D-glutamate metabolism. b. Metabolism of alanine, aspartate and glutamate. c. Arginine biosynthesis. d. Arginine and proline metabolism.

Figure 3 Amino acid metabolic pathways associated with the NAFLD model

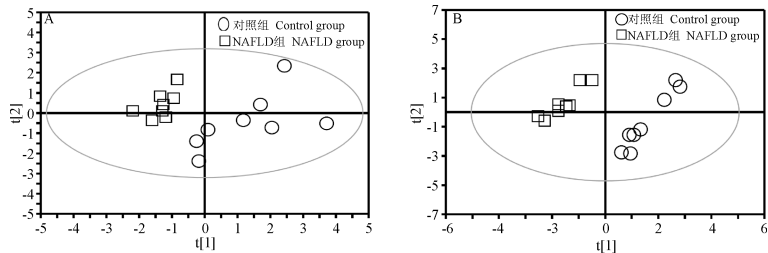


图 4 LPC 和氨基酸代谢轮廓的 PCA 散点图

Figure 4 PCA scatter plot of LPC and amino acid metabolism profile

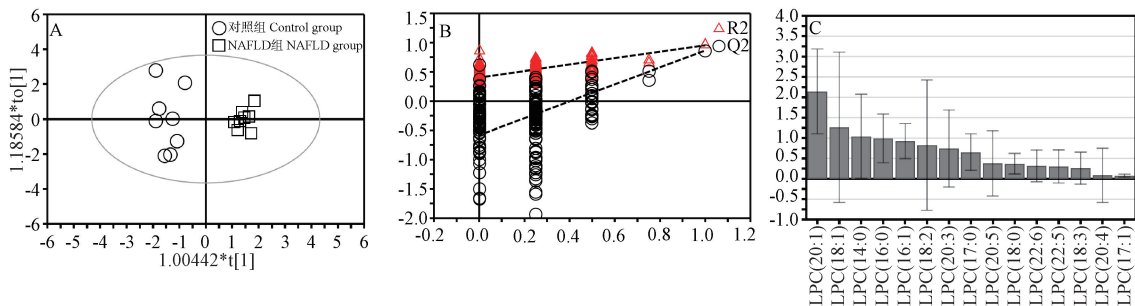


图 5 血清 LPC 代谢轮廓的 OPLS-DA 模型散点图、置换检验图和 VIP 图

Figure 5 Scatter diagram, displacement test diagram and VIP diagram of OPLS-DA model of serum LPC metabolic profile

表 3 LPCs 和氨基酸浓度与生化指标水平之间的相关性分析结果

生物标志物 Metabolites	AST		ALT		LDL		TBIL	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
溶血磷脂酰胆碱(20:1) LPC(20:1)	-0.507	0.045	-0.474	0.064	-0.525	0.037	-0.284	0.286
精氨酸 Arginine	-0.688	0.003	-0.568	0.022	-0.717	0.002	-0.638	0.008
谷氨酸 Glutamic acid	0.356	0.176	0.272	0.308	0.391	0.134	0.536	0.032

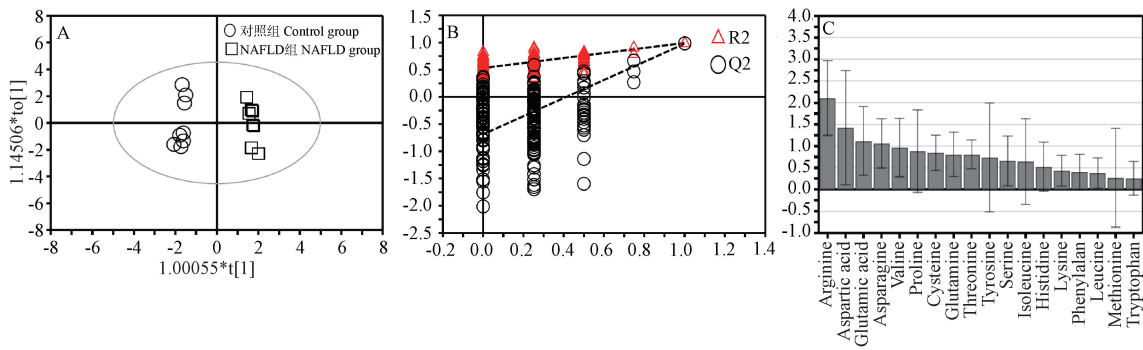


图6 血清氨基酸代谢轮廓的 OPLS-DA 模型散点图、置换检验图和 VIP 图

Figure 6 Scatter diagram, displacement test diagram and VIP diagram of OPLS-DA model of serum amino acid metabolism profile

与合成的主要脏器,肝损伤将导致血清中 LPCs 和氨基酸的水平变化。根据多变量统计分析结果,NAFLD 组的大鼠血清中 LPC 和氨基酸的代谢轮廓明显偏离正常水平,LPC (20 : 1)、精氨酸和谷氨酸被鉴定为表征 NAFLD 的生物标志物,且与生化指标具有一定相关性,表明血清 LPC 和氨基酸代谢与 HFD 和 CCl₄ 诱导 NAFLD 存在明显相关性。磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PCs) 在磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 的作用下水解为 LPCs, LPCs 在自分泌运动因子 (autotaxin, ATX) 或溶血磷脂酶 D 的作用下, LPCs 继续水解为溶血磷脂酸 (LPAs) [14-16]。LPC 在溶血磷脂酰胆碱转移酶 (lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT) 作用下 LPCs 合成 PCs [17-18]。KAFFE 等 [19] 研究发现在 CCl₄ 肝纤维化模型中 PLA2 活性提高, PCs 水解成 LPCs, 该纤维化模型中高水平 ATX 使 LPCs 继续转化为 LPAs, 最终导致 LPCs 浓度降低。在药源性肝损伤、酒精性肝损伤和非酒精性脂肪性肝炎等肝疾病中, 体内自动防御功能激活 LPCAT, 使肝组织中 LPCs 合成 PCs, 导致 PCs 水平增加, LPCs 水平降低 [20-21]。LPCs 定量分析结果表明 NAFLD 大鼠血清中大多数 LPCs 水平显著降低, 推测 NAFLD 可能影响 PLA2、LPCAT 和 ATX 等代谢酶或细胞因子的表达水平和活性。精氨酸在体内主要参与尿素循环, 精氨酸在精氨酸酶催化下水解生成 L-鸟氨酸和尿素。精氨酸酶在肝细胞内具有高活性, 血清中精氨酸的含量是肝细胞中的 10 倍以上。肝细胞受损后精氨酸被释放到血液中, 导致血清中精氨酸的水平显著降低 [22-23]。谷氨酸是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成的前体, GSH 是体内的重要抗氧化剂之一, 可以保护细胞免受氧化损伤。GSH 合成在肝损伤中增加, GSH 生物合成受损也会导致肝损伤的增

加。在肝损伤过程中, 谷氨酸含量增加具有生物学意义, 通过谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cystein ligase catalytic subunit, GCLC) 的反馈调节增加谷氨酸消耗, 从而增强 GSH 的生物合成 [24-25]。临床研究表明, 慢性 HBV 肝炎患者血清中的精氨酸浓度显著降低 [26]; HBV 相关的急性或慢性肝衰竭患者血清中 LPC (16 : 0) 和 LPC (18 : 0) 含量均显著降低 [27]。在 HFD 诱导 NAFLD 大鼠血清中这些物质含量的变化趋势与这两项研究相同, 提示 LPCs 和氨基酸与 NAFLD 模型有良好相关性。

本实验从 LPC 和氨基酸代谢的层面上评价了 HFD 和 CCl₄ 诱导大鼠 NAFLD, 并结合化学计量学方法分析 LPC 和氨基酸的代谢轮廓与 NAFLD 相关性, 并首次发现了 LPC (20 : 1) 和精氨酸与 NAFLD 具有极强的相关性, 这两种化合物有望成为 NAFLD 临床判定的特异性生物标志物, 为 NAFLD 的精确诊断和治疗提供方向。

参 考 文 献 (References)

[1] NEGI C K, KHAN S, DIRVEN H, et al. Flame retardants-mediated interferon signaling in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8) : 4282.

[2] HU C, LI H W, KE J Q, et al. Metabolic profiling of lysophosphatidylcholines in chlorpromazine hydrochloride- and N-acetyl-*p*-amino-phenoltriptolide-induced liver injured rats based on ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41 : 9603271221108320.

[3] HU C, LI H, WU L, et al. Metabolic profiling of 19 amino acids in triptolide-induced liver injured rats by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(10) : 1685-1697.

[4] PIRAUD M, RUET S, BOYER S, et al. Methods in molecular biology [M]. France : Rajat K. De, Namrata Tomar; 2011.

[5] TANAKA N, MATSUBARA T, KRAUSZ K W, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with

- nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2012, 56(1): 118–129.
- [6] CARNEIRO A B, IACIURA B M, NOHARA L L, et al. Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76233.
- [7] MAGALHÃES K, ALMEIDA P E, ATELLA G, et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(9): 1369–1379.
- [8] LIU P, ZHU W, CHEN C, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 247: 117443.
- [9] RIVERA C A, BRADFORD B U, HUNTER K J, et al. Attenuation of CCL₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281: G200-G207.
- [10] KUMAR P, LIU C, HSU J W, et al. *Glycine* and N-acetylcysteine (GlyNAC) supplementation in older adults improves glutathione deficiency, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, insulin resistance, endothelial dysfunction, genotoxicity, muscle strength, and cognition: results of a pilot clinical trial [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(3): e372.
- [11] BAO W D, FAN Y, DENG Y Z, et al. Iron overload in hereditary tyrosinemia type 1 induces liver injury through the Sp1/Tfr2/hepcidin axis [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 137–145.
- [12] NEUCKERMANS J, LEQUEUE S, CLAES P, et al. Hereditary tyrosinemia type 1 mice under continuous nitisinone treatment display remnants of an uncorrected liver disease phenotype [J]. *Genes*, 2023, 14(3): 693.
- [13] WANG D, TANG L, ZHANG Y, et al. Regulatory pathways and drugs associated with ferroptosis in tumors [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(6): 544.
- [14] FUNK C D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology [J]. *Science*, 2001, 294(5548): 1871–1875.
- [15] SALGADO-POLO F, FISH A, MATSOUKAS M T, et al. Lysophosphatidic acid produced by autotaxin acts as an allosteric modulator of its catalytic efficiency [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(37): 14312–14327.
- [16] CLARK J M, SALGADO-POLO F, MACDONALD S J F, et al. Structure-based design of a novel class of autotaxin inhibitors based on endogenous allosteric modulators [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(8): 6338–6351.
- [17] ZHANG D, JASIEŃECKA-GAZARKIEWICZ K, WAN X, et al. Molecular characterization of two lysophospholipid: acyl-CoA acyltransferases belonging to the MBOAT family in *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144653.
- [18] ZHANG Q, YAO D, RAO B, et al. The structural basis for the phospholipid remodeling by lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6869.
- [19] KAFFE E, MAGKRIOTI C, AIDINIS V. Deregulated lysophosphatidic acid metabolism and signaling in liver cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(11): 1626.
- [20] ZHAO Y, CHEN Y Q, BONACCI T M, et al. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8258–8265.
- [21] TIAN Y, JELLINEK M J, MEHTA K, et al. Membrane phospholipid remodeling modulates nonalcoholic steatohepatitis progression by regulating mitochondrial homeostasis [J]. *Hepatology*, 2024, 79(4): 882–897.
- [22] HOLEČEK M, MRÁZ J, TILŠER I. Plasma amino acids in four models of experimental liver injury in rats [J]. *Amino Acids*, 1996, 10(3): 229–241.
- [23] TANG K, ZHANG H, DENG J, et al. Ammonia detoxification promotes CD8⁺ T cell memory development by urea and citrulline cycles [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(1): 162–173.
- [24] ZHANG C, YANG Y, LIANG W, et al. Neuroprotection by urate on the mutant hSOD1-related cellular and *Drosophila* models of amyotrophic lateral sclerosis: implication for GSH synthesis via activating Akt/GSK3 β /Nrf2/GCLC pathways [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 146: 287–301.
- [25] ROCHETTE L, DOGON G, RIGAL E, et al. Lipid peroxidation and iron metabolism: two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 449.
- [26] TANG Y S, GUO J C, XU L, et al. Pathological change of chronic hepatitis B patients with different tongue coatings by circular multi-omics integrated analysis [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(1): 28–35.
- [27] NIE C Y, HAN T, ZHANG L, et al. Cross-sectional and dynamic change of serum metabolite profiling for Hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure by UPLC/MS [J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(1): 53–63.

[收稿日期] 2023-09-22