

· 论著 ·

合生元益生菌治疗自发性高血压相关机制的代谢组学研究

张莉敏¹, 陈宇峰², 战莹², 武晓丹², 周玉虹³ (1. 复旦大学附属华东医院, 上海 200050; 2. 原沈阳军区总医院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的 应用代谢组学相关技术, 从表观水平探索合生元制剂通过调节肠道菌群达到降压效应的可能作用机制。**方法** 将14只自发性高血压大鼠随机分为2组, 模型组和治疗组各7只, 另取7只Wistar Kyoto大鼠作为对照组, 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)技术对对照组、原发性高血压模型组和合生元制剂治疗组的大鼠模型回肠段进行代谢组学分析, 筛选合生元制剂治疗自发性高血压的潜在生物学标志物。**结果** 通过对代谢组学的分析, 确定了对照组与模型组之间具有显著差异的27种代谢物。在这些代谢物中, 与模型组相比, 治疗组中溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPE)和磷脂酰胆碱(PC)可以显著被重新调节。**结论** 合生元制剂可以通过改变肠道微生物群的结构, 调节LysoPE和PC相关信号通路, 进而改善自发性高血压状态; 代谢组学有助于从分子水平理解自发性高血压发病机制及合生元制剂的降压机制。

[关键词] 自发性高血压大鼠; 代谢组; 合生元; 超高效液相色谱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0141-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.008

Metabonomics study on the antihypertensive mechanism of lactobacillus and bifidobacterium in the spontaneous hypertensive rats

ZHANG Limin¹, CHEN Yufeng², ZHAN Ying², WU Xiaodan², ZHOU Yuhong³ (1. Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200050, China; 2. General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, China; 3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective** To explore the possible mechanism of synergistic effect of synbiotic preparations by regulating intestinal flora to achieve antihypertensive effect by the metabolomics-related techniques. **Methods** Fourteen spontaneously hypertensive rats were randomly divided into two groups, 7 rats in each of the model group and the treatment group, and another 7 Wistar Kyoto rats were used as the control group. Ileum metabolic profiling among the control group, Spontaneous hypertension model group and symbiotic treatment group were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF MS). The potential biomarkers for the treatment of spontaneous hypertension were selected. **Results** In addition, 27 metabolites with significant differences between the control and model group were identified by analysis of metabolomics. Among these metabolites, LysoPE and PC could be significantly re-regulated in the treatment group, compared with the model group. **Conclusion** Synbiotics could improve the status of spontaneous hypertension by changing the structure of the intestinal microbiota, regulating LysoPE and PC-related signaling pathways. Metabolomics could help to understand the pathogenesis of essential hypertension and the hypotensive mechanism of synbiotics at the molecular level.

[Key words] spontaneously hypertensive rats; metabolomics; synbiotics; UHPLC

高血压可分为原发性高血压及继发性高血压两大类。原发性高血压占高血压患者的95%以上, 其病因尚未阐明, 目前认为是在一定的遗传背景下由

于多种后天环境因素作用使正常血压调节机制失代偿所致。长期高血压可成为多种心脑血管疾病的重要危险因素, 并影响重要脏器如心、脑、肾的功能, 最终可导致这些器官功能衰竭^[1]。肠道菌群在维持肠道和全身免疫系统的功能中起到重要作用。最近有研究表明肠道菌群失调与肥胖、糖尿病、冠心病和代谢综合征相关。本课题前期应用自发性高血压大鼠模型(SHR)进行的合生元对血压影响的相关研

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20170540954)

[作者简介] 张莉敏, 主治医师, 硕士, 研究方向: 老年心血管疾病, Email: ssmujo_siva@163.com

[通讯作者] 陈宇峰, 主管药师, 博士, Email: yufengchen1978@163.com

究认为,与模型组相比,合生元可显著降低治疗组第4~7周SHR的收缩压(SBP);撤出合生元后,治疗组SHR的SBP迅速反弹,并且逐渐与模型组的SBP相当;然而,在重新给予合生元后,SBP开始逐渐减低,由此可发现给予自发性高血压大鼠合生元制剂能够有效降低SBP,但对其降压机制尚不清楚。本研究应用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)技术研究不同血压状态的大鼠回肠段代谢物的差异,揭示高血压状态的相关代谢标志物,从表观水平探索调节肠道菌群可使血压下降的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

选取14只6周龄雄性SHR和7只Wistar Kyoto大鼠(WKY),均购自北京维通利华有限公司,体重(160 ± 20)g,环境温度(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,建立12h光照/12h黑暗周期,动物自由进食和饮水。

1.2 药物制备和实验分组

所有大鼠被随机分为3组:WKY对照组($n=7$),SHR模型组($n=7$)和SHR治疗组($n=7$)。SHR治疗组口服冷冻干燥的合生元制剂,剂量为2.5g/kg,其中包含 2.5×10^9 CFU乳酸双歧杆菌、 2.5×10^9 CFU嗜酸乳杆菌(上海润盈生物工程有限公司)、0.3g低聚木糖和适量麦芽糖糊精。WKY对照组和SHR模型组口服相同剂量麦芽糖糊精(山东龙力生物科技有限公司)。所有大鼠每日服用2次,连续服用7周。

2 方法

2.1 组织提取

第7周给药后24h,所有大鼠用7.5%水合氯醛(0.3ml/100g)进行腹腔麻醉,碘伏消毒后打开腹腔,分离大鼠的回肠部分,在无菌PBS(0.1mmol/L, pH7.2)中分离并轻轻除去肠道内容物后,称重约50mg的回肠组织,置于冻存管内,用液氮迅速冷冻。

2.2 代谢组学分析

将组织置于1ml甲醇中,以70Hz匀浆2min。然后,混合物在4 $^{\circ}\text{C}$ 以13000r/min离心15min。将200 μl 上清液加入样品瓶中,用于基于UHPLC-Q-TOF/MS平台的代谢组学分析。LC-MS分析使用Agilent 1290 Infinity LC系统与Agilent 6538 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF)质谱仪(Agilent, USA)偶联。使用Waters XSelect HSS T₃分析柱(2.1mm \times 100mm, 2.5 μm , Waters,

Milford, MA)在25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行色谱分离。流动相为0.1%甲酸溶液(A)和0.1%甲酸(B)改性的乙腈。流速为0.4ml/min。优化的梯度洗脱条件:0~2min:5%B, 2~13min:5%~95%B, 13~15min:95%B。质谱以正离子和负离子2种模式运行。优化的毛细管电压参数:正极模式下4kV,负极模式下3.5kV。干燥气流速:10L/min。干燥气温度:325 $^{\circ}\text{C}$ 。喷雾气压:20psig。破裂电压:120V。挡热电压:45V。数据采集范围质荷比:100~1100m/z。正离子模式中的参考离子:121.0509~922.0098,负离子模式的参考离子:112.9856~1033.9881。

2.3 数据处理

使用Agilent MassHunter分析软件将LC-MS原始数据转换为通用数据格式(.mzdata)文件。使用XCMS软件包(<http://bioconductor.org/biocLite.R>)进行峰值提取,比对和整合,以在R平台中生成可视数据矩阵。然后,将数据矩阵导入SIMCA-P程序(Umetrics, 瑞典)进行重量归一化后的多变量统计分析。

应用SPSS 18.0软件进行统计学分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示。所得数据采用单因素方差分析和Tukey检验以评估3组的统计学显著性,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

偏最小二乘法-判别式分析(PLS-DA)是一种多元统计分析方法,用于对照组、模型组和治疗组的可视化趋势分析。如图1A、1B中ESI阳性模式和阴性模式的PLS-DA得分图所示,对照组在第一主成分中模型组和治疗组有较明显的区分趋势,模型组和治疗组聚集在一起,没有明显的区分趋势,说明模型组的代谢谱与对照组相比,明显受到干扰,且治疗组的代谢谱与模型组相似。

采用PLS-DA进一步筛选模型组和对照组之间的不同代谢物。图1C、1D显示模型组与对照组有明显的区分趋势。当计算2个成分时,累积R²X、R²Y和Q²分别为正模式下的0.419、0.937、0.693,而负模式下累计R²X、R²Y和Q²分别为0.565、0.942、0.826。这些结果表明PLS-DA模型具有良好的拟合度及预测能力用以筛选组间差异性变量。PLS-DA模式的载荷图(图1E、1F)可用于识别离子以区分这些组,其中远离原点的点被认为对组间差异贡献度大。VIP值反映了变量在差异中的重要性,大于1.0的代谢物被认为是差异代谢物。然后进行单因素方差分析和

Tukey 检验以评估3组的统计学显著性。最后,确定了对照组和模型组之间具有显著差异的27种代谢物。不同的代谢物详见表1。此外,在这些代

谢物中,与模型组相比,治疗组中的溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPE)和磷脂酰胆碱(PC)被显著重新调节。

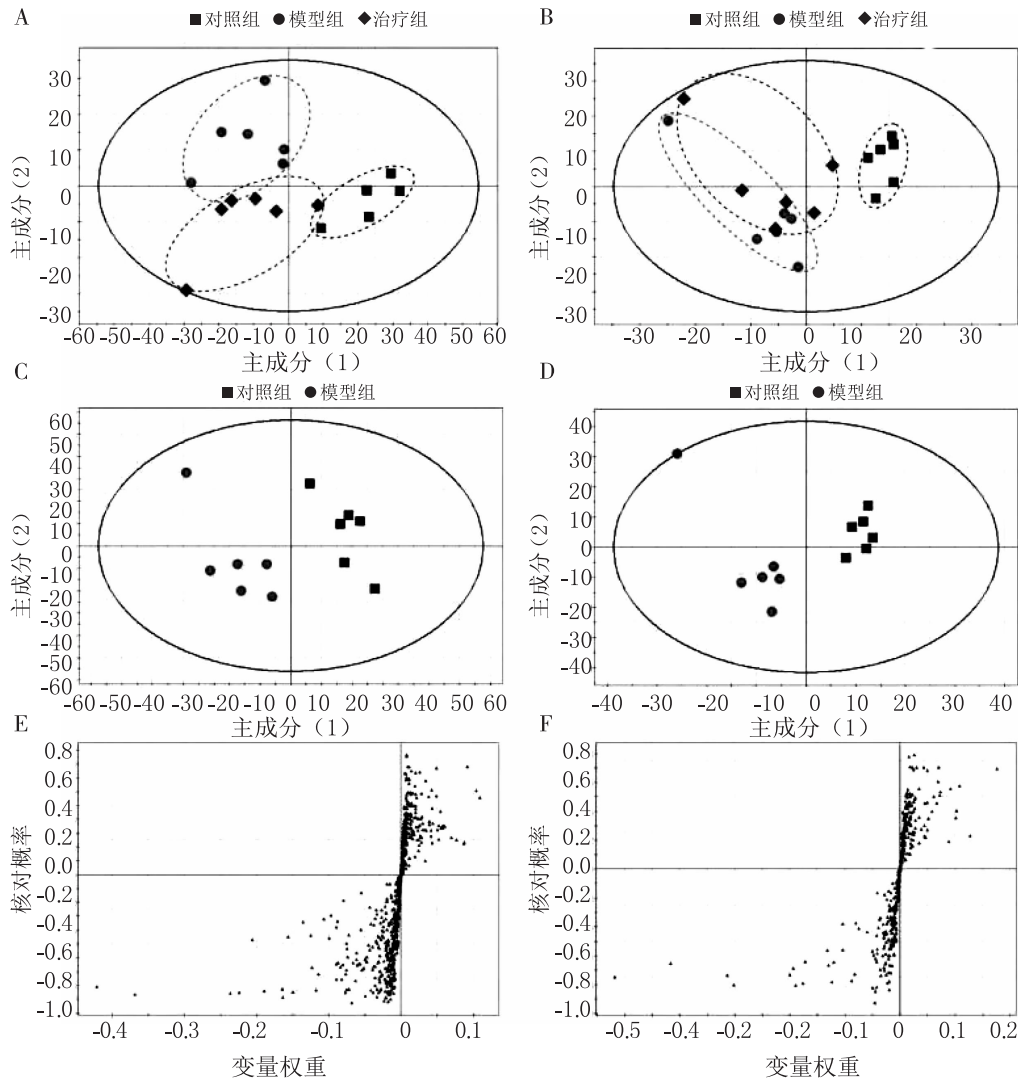


图1 对照组、模型组和治疗组的多变量统计分析图

表1 对照组、模型组和治疗组3组组间差异代谢物

序号	质荷比 (<i>m/z</i>)	保留时间 (<i>t</i> /min)	VIP 值	倍数 (M/C)	<i>P</i> 值 (M/C)	倍数 (T/M)	<i>P</i> 值 (T/M)	粒子模式	分子式	代谢物名称	相关途径
1	259.023	0.73	1.74	1.50	0.0051	0.97	0.9328	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	D-Glucose 6-phosphate	inositol phosphate metabolism
2	167.020	0.88	2.41	0.79	0.0295	1.16	0.2239	[M-H] ⁻	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	uric acid	purine metabolism
3	169.035	1.00	1.40	0.74	0.0120	1.05	0.8666	[M+H] ⁺	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	uric acid	purine metabolism
4	133.032	1.00	1.49	1.27	0.0439	1.04	0.8597	[M+H] ⁺	C ₅ H ₈ O ₂ S	THTC	—
5	346.055	1.02	1.02	2.35	0.0015	1.15	0.5178	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	adenosine monophosphate	cAMP signaling pathway
6	153.040	1.03	2.01	3.90	0.0318	0.53	0.2117	[M+H] ⁺	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	xanthine	purine metabolism
7	318.300	9.31	1.17	1.95	0.0491	0.56	0.0763	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	phytosphingosine	sphingolipid metabolism
8	526.294	10.16	1.03	1.41	0.0022	0.89	0.2746	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₇ P	lysoPE(22 : 6/0 : 0)	glycerophospholipid metabolism
9	502.293	10.17	1.79	1.39	0.0013	0.81	0.0228	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₁ NO ₇ P	lysoPE(20 : 4/0 : 0)	glycerophospholipid metabolism
10	506.360	10.55	1.07	1.44	0.0419	0.98	0.9866	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₅₂ NO ₆ P	C-8 Ceramide-1-phosphate	sphingolipid metabolism
11	526.351	10.87	3.93	0.46	0.0014	1.00	1.0000	[M+FA-H] ⁻	C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P	lyso-PAF C-16	glycerophospholipid metabolism
12	917.628	10.89	1.72	0.42	0.0009	1.30	0.5811	[M-H] ⁻	C ₄₉ H ₉₁ O ₁₃ P	PI(18 : 0/22 : 2)	glycerophospholipid metabolism

(续表 1)

序号	质荷比 (<i>m/z</i>)	保留时间 (<i>t</i> /min)	VIP 值	倍数 (M/C)	<i>P</i> 值 (M/C)	倍数 (T/M)	<i>P</i> 值 (T/M)	离子模式	分子式	代谢物名称	相关途径
13	873.574	10.93	2.10	0.66	0.0313	1.05	0.9599	[M-H] ⁻	C ₅₀ H ₈₃ O ₁₀ P	PG(22:6)/22:2)	glycerophospholipid metabolism
14	524.336	10.96	3.24	1.98	0.0121	1.17	0.5210	[M+FA-H] ⁻	C ₂₄ H ₅₀ NO ₆ P	lysoPC(P-16:0)	glycerophospholipid metabolism
15	450.299	11.55	1.33	0.82	0.0366	1.06	0.7314	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₄₆ NO ₆ P	PC(O-14:1/0:0)	glycerophospholipid metabolism
16	494.36	12.40	1.10	2.05	0.0277	0.85	0.6780	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₂ NO ₆ P	PE(P-20:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism
17	536.407	12.49	2.18	1.55	0.0032	0.88	0.3748	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₅₈ NO ₆ P	PC(P-20:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism
18	280.263	12.68	1.19	1.61	0.0267	0.71	0.1011	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ NO	linoleamide	—
19	327.233	13.22	3.81	1.28	0.0041	0.93	0.4296	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	docosahexaenoic acid	biosynthesis of unsaturated fatty acids
20	835.664	13.39	1.92	2.47	0.0130	0.86	0.7194	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₈₃ N ₂ O ₆ P	SM(d18:2/24:0)	sphingolipid metabolism
21	833.631	13.39	2.93	0.29	0.0004	1.28	0.8284	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₈₉ O ₁₀ P	PG(18:0/22:1)	glycerophospholipid metabolism
22	303.232	13.40	6.54	1.20	0.0111	0.97	0.8438	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	arachidonic acid	arachidonic acid metabolism
23	804.552	13.57	5.58	2.09	0.0038	0.61	0.0265	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₈₀ NO ₆ P	PC(16:0/20:4)	glycerophospholipid metabolism
24	494.361	13.75	1.35	1.36	0.0335	0.92	0.6982	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₄ NO ₆ P	PE(O-20:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism
25	305.248	13.82	1.42	1.39	0.0081	0.84	0.1581	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	eicosatrienoic acid	linoleic acid metabolism
26	538.423	13.94	3.21	1.53	0.0267	0.88	0.5969	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₅₀ NO ₆ P	PC(O-20:0/0:0)	glycerophospholipid metabolism
27	331.264	14.09	3.92	1.32	0.0171	0.96	0.8416	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	docosatetraenoic acid	biosynthesis of unsaturated fatty acids
28	281.248	14.26	3.10	1.31	0.0027	0.93	0.4364	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	oleic acid	fatty acid biosynthesis

4 讨论

目前多项对原发性高血压发病机制的研究表明其不仅与血流动力学异常有关,也与人体生化代谢紊乱密切相关,大部分患者常伴有糖代谢和血脂代谢异常现象,原发性高血压与生化代谢异常等危险因素相互协同、共同导致心血管系统的损害,但其发病机制尚不明确^[2]。一系列临床研究评估了肠道菌群对血压的影响。一项包含了9个临床试验在内的Meta分析表明,每天摄入一定量益生菌的人群血压显著降低,表明肠道菌群对维持血压稳定起着重要作用^[3]。代谢组学是指通过核磁共振、色谱、质谱等技术手段,定性和定量分析各种代谢路径的小分子代谢物^[4],用以分析整体的生物学状况和基因功能调节,探寻生命活动的整体代谢状况,从而更好地理解生命活动规律^[5]。目前对于高血压代谢组学的研究主要集中在血液代谢组学和尿液代谢组学的研究,表明高血压患者氨基酸和脂肪酸代谢紊乱失衡^[6-8]。本实验通过研究自发性高血压大鼠及使用合生元制剂治疗后大鼠回肠段代谢产物异常来揭示合生元制剂治疗原发性高血压的可能机制。

代谢组学结果显示,治疗组回肠段 LysoPE 和 PC 水平明显高于模型组。LysoPE 是磷脂酰乙醇胺(PE)的分解产物,存在于所有生物的细胞中,是细胞膜的微量成分,在细胞介导的细胞信号转导和

其他酶的活化中起作用^[7]。PC 在自然界中无处不在,是细胞膜脂双层结构的关键组成部分,也涉及新陈代谢和信号传导^[8]。PC 可以通过3种不同的途径合成。一是胆碱首先通过磷酸化激活,然后在连接磷脂酸之前通过与 CDP 偶联来激活;二是通过将胆碱加入 CDP 活化的 1,2-二酰甘油来合成;第3条途径是将 PS 或 PE 转换为 PC。有文献报道 LysoPE 和 PC 可通过肠道细菌发酵饮食及其代谢产物(如游离脂肪酸),特异性激活 PPAR 途径并促进 PPARs 的表达^[9]。因此,合生元制剂可以通过改变肠道微生物群的结构,调节 PPAR 信号通路,从而激活 PPAR β 和 γ 在回肠节段中的级联反应,进而改善自发性高血压状态。

【参考文献】

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-743.
- [2] ZHENG Y, YU Alexander D, et al. Metabolomics and incident hypertension among blacks; the atherosclerosis risk in communities study [J]. Hypertension, 2013, 62(2): 398-403.
- [3] YANG T, SANTISTEBAN M M, RODRIGUEZ V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension [J]. Hypertension, 2015, 65(6): 1331-1340.
- [4] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. Metabonomics; understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999,

- 29(11):1181-1189.
- [5] SCHNACKENBERG L K B R. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology[J]. *Pharmacogenomics*, 2006, 7(7): 1077-1086.
- [6] AUSTDAL M, TANGERAS L H, SKRASTAD R B, et al. First trimester urine and serum metabolomics for prediction of preeclampsia and gestational hypertension: a prospective screening study[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21520-21538.
- [7] RYU S B. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 229-235.
- [8] ROCK C O, JACKOWSKI S, CRONAN J E, et al. Lipid metabolism in prokaryotes[J]. *Biochem Lip Lipoprot Membr*, 1996; 35-74.
- [9] ZHAO Q, LI X M, LIU H N, et al. Metabolic map of osthole and its effect on lipids [J]. *Xenobiotica*. 2018, 48(3): 285-299.
- [收稿日期] 2018-08-03 [修回日期] 2018-11-30
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 120 页)

- [12] 徐立丽. 含化学促渗剂驻极体 5-FU 贴剂体外经皮转运和抑制瘢痕生长的动物实验研究[D]. 上海:第二军医大学, 2017: 14-49.
- [13] 李荟元. 瘢痕的药物治疗进展[J], *中国临床康复*, 2002, 6(8): 1090-1092.
- [14] 郝冬月, 李小静. 5-氟尿嘧啶在病理性瘢痕治疗中的应用进展[J], *中华医学美容杂志*, 2010, 16(4): 286-288.
- [15] 孔德平, 陈凯. 5-氟尿嘧啶对增生性瘢痕的作用研究[J], *重庆医学*, 2015, 44(8): 1029-1031.
- [16] 杨卫玺, 杨敏烈, 吕国忠. 药物注射法治疗 60 例增生性瘢痕的疗效观察[J], *中国美容医学*, 2010, 19(3): 323-325.
- [17] JIANG J, LIANG Y, DONG F, et al. Study of electret effect of rat skin by thermally stimulated discharge analysis[J]. *J Electrostat*, 2012, 70(3): 258-263.
- [18] 梁媛媛, 江键, 程亮, 等. 负极性聚丙烯驻极体美洛昔康贴剂对大鼠皮肤结构的影响[J]. *解剖学杂志*, 2009, 32(4): 502-505.
- [19] 苑旺, 梁媛媛, 崔黎丽, 等. 正极性聚丙烯驻极体对糖尿病大鼠皮肤结构的影响[J]. *中国医学物理学杂志*, 2015, 32(6): 835-840.
- [20] TU Y, WANG X, LU Y, et al. Promotion of the transdermal delivery of protein drugs by N-trimethyl chitosan nanoparticles combined with polypropylene electret[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 5549-5561.
- [收稿日期] 2018-06-15 [修回日期] 2018-11-12
[本文编辑] 陈盛新