第 2 卷◆第 3 期◆版本 1.0◆2024 年
文章类型：论文 |刊号（ISSN）：2972-4457(P) / 2972-452X(O)

探讨高糖对心肌代谢变化的影响

——基于非靶向代谢组学

李文杰　马良　高岩坡　霍春玲
邯郸科技职业学院
DOI:10.12238/ffcr.v2i3.9175

[摘　要] 目的：对基于非靶向代谢组学获得的差异代谢物进行分析,为LC-MS/MS技术开发及研究糖尿病状态下心功能损伤机制提供可靠依据。方法：实验动物为6-8周龄C57BL/6雄性小鼠,糖尿病模型组小鼠腹腔注射单剂量(150mg/kg体重)链脲佐菌素(STZ),给药一周后,连续两次空腹血糖≥16.7mmol/L的小鼠被认为是糖尿病。6周后,糖尿病组小鼠,空腹血糖升高,体重下降,心功能受损,则动物模型构建成功。取小鼠心脏组织,基于LC-MS/MS平台进行非靶向代谢组学分析及统计。结果：获得差异代谢物1690种,涉及脂肪酸、脂酰基肉碱、甘油三酯、甘油二酯、磷脂、溶血磷脂等多种脂类。结论：利用LC-MS/MS平台可进行糖尿病状态下小鼠心肌脂质代谢物的非靶向代谢组学研究,获得多种异常代谢物,说明糖尿病状态下造成心肌组织代谢变化。
[关键词] 非靶向代谢组学；糖尿病；心肌；代谢
中图分类号：R587.1　文献标识码：A

To explore the effect of high glucose on changes in cardiac metabolism

--Based on untargeted metabolomics

Wenjie Li　Liang Ma　Yanpo Gao　Chunling Huo
Handan Vocational College of Science and Technology

[Abstract] objective to analyze the differential metabolites obtained based on non-targeted metabonomics, and to provide reliable basis for the development of LC-MS/MS technology and the study of the mechanism of cardiac function injury in diabetes mellitus. Methods C57BL/6 male mice aged 6-8 weeks were used as experimental animals. Mice in diabetic model group were injected with a single dose (150 mg/kg body weight) of streptozotocin (STZ) intraperitoneally. After one week of administration, mice with fasting blood glucose ≥16.7 mmol/L for two consecutive times were considered as diabetes. After 6 weeks, the diabetic mice had increased fasting blood sugar, lost weight and impaired heart function, and the animal model was successfully established. Mouse heart tissues were taken and analyzed by non-targeted metabonomics based on LC-MS/MS platform. Results 1690 kinds of differential metabolites were obtained, involving fatty acids, fatty acyl carnitine, triglycerides, diglycerides, phospholipids, lysophospholipids and other lipids. Conclusion The LC-MS/MS platform can be used to study the non-targeted metabolomics of myocardial lipid metabolites in diabetic mice, and a variety of abnormal metabolites can be obtained, which indicates that it is caused by diabetes. A variety of abnormal metabolites were obtained, which indicates the metabolic changes of subordinate myocardial tissue in the diabetic state.
[Key words] non-targeted metabolomics; diabetes; myocardial; metabolism

前言

全球范围内,糖尿病(DM)患者越来越多,在美国糖尿病的发病率为9.3%[1]。而糖尿病患者中,心血管疾病是导致死亡的主要原因。其中,糖尿病性心肌病(DC)是一种糖尿病引起的病理生理状况,可导致心力衰竭[2]。高血糖严重影响了心肌的收缩功能,但高糖对心肌细胞损伤机制的研究十分有限。

代谢物,主要是指100~1000da内的小分子量化合物,作为代谢途径的底物、中间体或副产物,可以反映生物体对环境毒性刺

Copyright © This work is licensed under a Commons Attibution-Non Commercial 4.0 International License.

激的变化,揭示了细胞内不同路径的相互联系。代谢组学研究通过对代谢物的分析直观的描述了生物体的内在变化,研究依赖于各种高通量的技术平台。以前的研究中,散弹枪法通过离子源电离代谢物,不需要色谱分离但是,低丰度和硬离子脂类代谢物的电离受到明显抑制,不易分离,导致相关物质无法检测出[3-6]。LC-MS/MS(Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)技术把分离能力强的LC 和灵敏度高、准确性好的MS/MS结合,即可以定量又可以定性,可以检测样本中浓度相差大的代谢物等特点,成为代谢组学的研究中应用越来越多的技术平台。因此,本研究,利用LC-MS/MS技术,采用非靶向代谢组学方法探索高糖暴露下心肌细胞代谢物的变化,以期为研究高糖对心血管疾病的影响提供理论支持。

1 方法

1.1动物模型构建

实验动物为6-8周龄C57BL/6雄性小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[7](证书编号11400700128532)。小鼠随机分为对照组和糖尿病组,每组6-8只。糖尿病模型组小鼠腹腔注射单剂量(150mg/kg体重)链脲佐菌素(STZ)(Sigma0130,USA)。对照组小鼠经腹腔注射给予等量生理盐水。STZ给药一周后,连续两次空腹血糖≥16.7mmol/L的小鼠被认为是糖尿病。6周后,再次评估小鼠空腹血糖、体重、心功能等指标。数据显示糖尿病组小鼠,空腹血糖升高,体重下降,心功能受损,则动物模型构建成功。麻醉状态下,取小鼠心脏组织样品用于后续实验。

动物实验方案均按照河北医科大学动物实验伦理审查委员会制定的指导方针进行。

1.2 LC-MS/MS分析

称取100mg组织,加甲醇后超声,粉碎为组织匀浆,冰浴20min,10000xg,4℃离心10min,取600ul上清液冻干备用。检测前溶于100ul甲醇,取上清5ul进样。

色谱条件为：LC设备NexeraX2,Q-TOF设备Triple TOF5600+(sciex),配备分析软件MarkerView1.2.1进行数据采集和校准。流动相A为0.1%甲酸/水,流动相B为0.1%甲酸/乙腈。Column色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18,2.1X100mm,3.5um。流速为0.5 mL/min,并进行梯度洗脱。

质谱条件为：电喷雾电离(ESI)源,正离子电离模式。离子源温度(Source temperature)120℃,脱溶剂温度(desolvation temperature)500℃,脱溶剂氮气流600L/h,锥孔反吹氮气(cone gas flow)50L/h。正离子模式毛细管电离电压分别为3.0kV,取样锥孔电压(sampling cone)为27eV,萃取锥孔(extraction cone)4eV,四极杆扫描范围m/z50-1500[8]。

1.3数据分析

利用MetaboAnalyst5.0平台在线对数据进行以下统计分析：多元变量统计分析(主成分分析,Prin cipal Component Analysis,PCA；偏最小二乘判别分析,Partial Least Squares-Discriminant Analysis,PLS-DA)单变量统计分析(T-Tests)、差异化合物筛选和鉴定、代谢通路分析(Pathway Analysis)。

2 结果

2.1多元变量模式识别分析

从PCA(图1A)得分图可见每组样本所含变量/分子的组成和浓度均接近。从PLS-DA(图1B)得分图可见实验组和对照组样本两组间分离,表明两组样本代谢物分离效果显著。PCA和PLS-DA分析显示,两组数据分离性较好,表明两组心脏组织代谢特征存在显著差异。

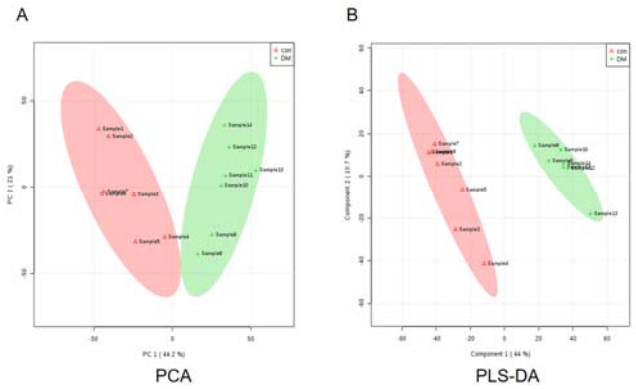


图1 PCA(图1A)得分图与PLS-DA(图1B) 得分图

2.2单变量统计分析

T-Tests检验结果显示,与对照组相比,实验组心肌组织代谢物中有1690个物质存在显著差异,P<0.05(图2)。

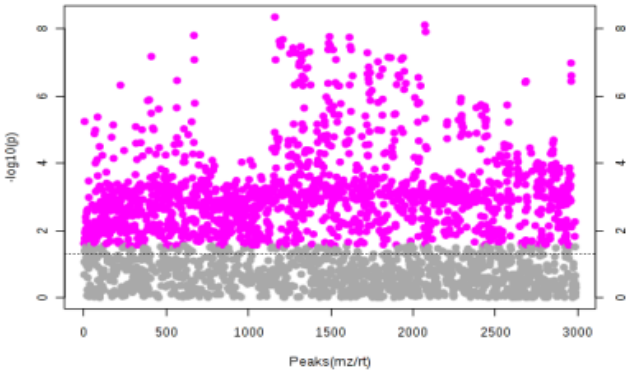


图2 T-Tests 分析

2.3糖尿病小鼠心脏组织代谢物KEGG通路分析

KEGG(Impact>0)通路分析表明关键代谢物参与了5条代谢通路(表1),Glycerophospholipid metabolism是受影响最大的通路。

表1 KEGG通路分析

富集的pathway	Total	Hits	Raw p	Impact
Glycerophospholipid metabolism	30	3	0.003285	0.25525
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	14	1	0.13902	0.0439
Fatty acid elongation in mitochondria	27	1	0.25175	0.0037
Fatty acid metabolism	39	1	0.34344	0.00034
Purine metabolism	68	1	0.52357	0.00102

3 讨论

Copyright © This work is licensed under a Commons Attibution-Non Commercial 4.0 International License.

代谢组学能够对物体内源性代谢物质的整体及其随内因和外因变化进行研究,常用的技术平台有核磁共振(NMR)、质谱(LC-MS\GC-MS)等。LC-MS/MS技术把LC 和MS/MS结合,即可以定量又可以定性。与核磁共振(NMR)相比,LC-MS/MS对样本制备要求不高、灵敏度高、动态范围宽,可以检测样本中浓度相差大的代谢物等特点,成为代谢组学的研究中应用越来越多的技术平台。

糖尿病是常见的代谢性疾病,由其引发的并发症更是加剧了疾病的发展进程,严重影响人类健康,其中糖尿病造成的心肌功能受损引起越来越多的关注。本研究通过非靶向代谢组学研究,对糖尿病状态下心肌代谢进行研究,获得了多种差异性代谢产物。

通过对获得数据的PCA及PLS-DA分析,说明本研究获得的数据具有代表性和较好的重复性。经T-Tests 检验分析,我们获得的1690多个差异代谢物,化合物指认后可见包含脂肪酸、脂酰基肉碱、甘油三酯、甘油二酯、磷脂、溶血磷脂 等多种脂类,LC-MS/MS技术平台满足我们对实验设备的需求,也说明糖尿病状态下,心脏脂质代谢发生了显著变化。

对检测到的差异代谢物进行KEGG通路分析显示,差异代谢物可富集于Glycerophospholipid metabolism等5条通路。提示,代谢物质的差异变化与相关通路的调控相关。

4 结论

本文利用LC-MS/MS技术平台,对糖尿病状态下,小鼠心肌组织进行了代谢组学研究,检测到多种差异代谢物质。说明,高糖状态下,存在包含脂质在内的多种代谢物差异。

[项目支持]

安阳市科技局科技计划项目,项目编号：2021C01SF038；邯郸市科技局2023年度科技专项计划项目,项目编号：23422083122；邯郸科技职业学院自然科学类项目,项目编号KJ202301；河北省2024年度医学科学研究课题,项目编号：20241518；河北省教育厅河北省高等学校科学研究计划项目,项目编号：QN2024285。

[参考文献]

[1]Wolfgang H Dillmann.Diabetic Cardiomyopathy[J].Circ Res 2019,124(8):1160-1162.

[2]但章勇,束传林,施晓蕊,等.ATPR通过抑制铁死亡缓解脂多糖诱导的小鼠急性心肌损伤[J].安徽医科大学学报,2023,58(3):373-377.

[3]Donkelaar A,Jerrett M,Martin RV etc. Spatial association between ambient fine particulate matter and incident hypertension[J].Circulation,2014,129(5):562-569.

[4]Cai H, Harrison D G.Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress[J].Cir Res,2000,87(10):840-844.

[5]Lin C, Wu S,Liang H etc.Metabolomic analysis of the effects of motorcycle exhaust on rat testes and liver[J].Aerosol Air Qual Res,2012,14(6):1714-1725.

[6]李博林.基于代谢组学的冬病夏治穴位贴敷防治支气管哮喘作用机制及临床疗效研究[D].河北医科大学,2016.

[7]金玉茜,李珂,尹学善.人源食管鳞状细胞癌移植瘤模型的建立及其增殖信号通路特征[J].中国病理生理杂志,2016,32(8):1450-1456.

[8]刘永霞,朱小丽,陈玉华.雄激素非依赖前列腺癌细胞系代谢组学的初步研究[J].分析化学,2011,39(3):305-311.

作者简介：

李文杰(1985--),女,汉族,河北省邯郸市人,博士研究生,讲师,医药卫生系副主任,研究方向：脂质代谢,传染病学,分子生物学。

Copyright © This work is licensed under a Commons Attibution-Non Commercial 4.0 International License.