

· 药物代谢 ·

## 主动脉弓缩窄术建立心力衰竭大鼠模型的病理过程观察与非靶向代谢组学分析

钟森杰, 熊霞军, 张倩, 胡思远, 杨梦, 黄淑敏, 方格, 王梓仪, 胡志希\*, 李琳\*  
(湖南中医药大学 中医诊断研究所, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:研究主动脉弓缩窄(TAC)致大鼠心力衰竭的病理过程与心肌组织代谢产物变化规律。方法:对大鼠进行TAC术,术后分为TAC-30 d组与TAC-60 d组,另设立同时段的假手术组作对照。对各组大鼠进行超声心动图和心肌组织病理染色;利用酶联免疫吸附测定法检测血清氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和三磷酸腺苷(ATP)含量;液相色谱-质谱联用技术观察心肌组织代谢产物与关联通路的变化特征,流动相水(A,含25 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵和25 mmol·L<sup>-1</sup>氨水)-乙腈(B)梯度洗脱(0~0.5 min, 95%B; 0.5~7 min, 95%~65%B; 7~8 min, 65%~40%B; 8~9 min, 40%B; 9~9.1 min, 40%~95%B; 9.1~12 min, 95%B),电喷雾离子源,正、负离子检测模式,采集范围 $m/z$  70~1 050。结果:与假手术30 d组比较,TAC-30 d组的左室收缩末期内径(LVIDs)显著下降( $P<0.01$ ),左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(FS)、左室后壁舒张末期厚度(LVPWd)、左室后壁收缩末期厚度(LVPWs)显著上升( $P<0.01$ );心肌细胞排列紊乱、水肿,胶原纤维增生;NT-proBNP含量显著上升、ATP含量显著下降( $P<0.01$ );15种代谢产物表达异常,涉及嘧啶代谢通路、泛酸和辅酶A生物合成通路。与假手术60 d组比较,TAC-60 d组的LVEF、FS显著下降( $P<0.01$ ),左室舒张末期内径(LVIDd)、LVIDs、LVPWd明显上升( $P<0.05, P<0.01$ );心肌细胞水肿明显增大,肌纤维变性,出现凝固性坏死,大量胶原纤维沉积;NT-proBNP含量显著上升、ATP含量显著降低( $P<0.01$ );21种代谢产物表达异常,涉及嘧啶代谢通路、淀粉和蔗糖代谢通路。结论:TAC术后30 d为心肌肥厚阶段,脂代谢障碍,嘧啶代谢紊乱,能量失衡;TAC术后60 d为心力衰竭阶段,脂代谢障碍加重,糖代谢过度激活,嘧啶代谢持续紊乱。

**[关键词]** 主动脉弓缩窄(TAC); 心肌肥厚; 慢性心力衰竭; 代谢组学; 液质联用技术; 生物标志物; 代谢通路

**[中图分类号]** R22;R28;R96;R541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0117-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211775 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210719.1512.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-19 16:43

### Pathological Process Observation and Non-targeted Metabolomics Analysis of Heart Failure Rat Model Established by Transverse Aortic Constriction

ZHONG Sen-jie, XIONG Xia-jun, ZHANG Qian, HU Si-yuan, YANG Meng, HUANG Shu-min,  
FANG Ge, WANG Zi-yi, HU Zhi-xi\*, LI Lin\*

(Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis,  
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the pathological process and changes of metabolites in myocardial tissue of heart failure induced by transverse aortic constriction (TAC) in rats. **Method:** Rats were treated with TAC operation and divided into TAC-30 d group and TAC-60 d group, and sham operation group at the same period was set up as control. Echocardiography and pathological staining of myocardial tissue were performed on

**[收稿日期]** 2021-06-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774208);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4062,2020JJ5408,2019JJ50447);湖南省中医药科研计划项目青年课题(2021180)

**[第一作者]** 钟森杰,在读博士,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:634960445@qq.com

**[通信作者]** \* 胡志希,博士,教授,博士生导师,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:003405@hnu.cm.edu.cn;

\* 李琳,博士,讲师,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:lilin@hnu.cm.edu.cn

rats in each group. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the expression of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and adenosine triphosphate (ATP) in serum. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to observe the changes of metabolites and related pathways in myocardial tissue, the mobile phase consisted of 25 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate and 25 mmol·L<sup>-1</sup> ammonia hydroxide in water (A) and acetonitrile (B) for gradient elution (0-0.5 min, 95%B; 0.5-7 min, 95%-65%B; 7-8 min, 65%-40%B; 8-9 min, 40%B; 9-9.1 min, 40%-95%B; 9.1-12 min, 95%B), electrospray ionization was used under positive and negative ion detection modes, acquisition range was *m/z* 70-1 050. **Result:** Compared with the sham-30 d group, the left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs) in TAC-30 d group was significantly decreased ( $P<0.01$ ), and left ventricular ejection fraction (LVEF), fraction shortening (FS), left ventricular end-diastolic posterior wall thickness (LVPWd), left ventricular end-systolic posterior wall thickness (LVPWs) were significantly increased ( $P<0.01$ ), there were cardiomyocyte arrangement disorder, edema, collagen fibre hyperplasia, the content of NT-proBNP was significantly increased, while the content of ATP was significantly decreased ( $P<0.01$ ), and 15 metabolites with abnormal expression were involved in pyrimidine metabolic pathway, pantothenic acid and coenzyme A biosynthesis pathway. Compared with the sham-60 d group, LVEF and FS in the TAC-60 d group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDd), LVIDs and LVPWd were increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the edema of myocardial cells increased obviously, myocardium fibers degenerated, coagulation necrosis appeared, and a large amount of collagen fibers were deposited, the expression of NT-proBNP increased and the expression of ATP decreased ( $P<0.01$ ), there were 21 metabolites with abnormal expression, involving pyrimidine metabolic pathway, and starch and sucrose metabolic pathway. **Conclusion:** At 30 d after TAC, there are myocardial hypertrophy, lipid metabolism disorder, pyrimidine metabolism disorder and energy imbalance. At 60 d after TAC, there are heart failure, aggravation of lipid metabolism disorder, excessive activation of glucose metabolism, and continuous disorder of pyrimidine metabolism.

**[Keywords]** transverse aortic constriction (TAC); myocardial hypertrophy; chronic heart failure; metabolomics; liquid chromatography-mass spectrometry technology; biomarkers; metabolic pathways

主动脉弓缩窄(TAC)可致使主动脉压力升高而加重左心室后负荷,诱发心肌肥厚,进而演变为慢性心力衰竭,TAC术是制备压力超负荷型心力衰竭模型的理想方法<sup>[1]</sup>。据报道,TAC模型的构建多使用C57BL/6小鼠,其大鼠模型相关研究则较为滞后,且术中缩窄程度、术后形成心力衰竭时间等方面尚未形成统一共识,致使各类TAC大鼠模型的稳定性与可靠性不一致<sup>[2-3]</sup>。此外,当前研究多聚集于TAC术后某一时间节点,缺乏对整体进程中病理特点、生物学特征的全局性探索。因此,本研究综合分析前期文献,采用TAC术建立心力衰竭大鼠模型,以心功能指标、心肌组织结构、心肌纤维化程度等为评价维度,动态观察TAC术致大鼠心力衰竭的病理过程,以评估模型合理性。

现阶段研究发现,心力衰竭病理过程中伴随多途径的代谢产物改变,代谢特征集中于心脏能量来源底物转移,即由脂肪酸供能向葡萄糖供能偏移。长期的底物代谢紊乱将致心脏能量来源缺乏,促进

心室重构,恶化心功能,即“能量代谢重构”<sup>[4]</sup>。不同类型心力衰竭的病理机制存在差异,但心脏产能底物转移是共同病理途径。本研究在所建立模型的基础上,拟运用液相色谱-质谱法(LC-MS)揭示TAC模型各病理阶段的心肌组织代谢产物特征,以期进一步阐明病理机制,为TAC模型的合理构建提供生物学依据。

## 1 材料

RWD407型小动物呼吸机(深圳瑞沃德生命科技有限公司),SonoScape-S2N型超声诊断仪(深圳开立生物医疗科技股份有限公司),MB-530型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司),Vanquish型超高效液相色谱仪和Q-Exactive HFX型高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),JXFSTPRP-24型研磨仪(上海净信科技有限公司),BA410E型显微镜[麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司]。氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号

F13038789),三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,批号L210212947),伊红染色液(无锡傲锐东源生物科技有限公司,批号20041701),苏木素染液(合肥白鲨生物科技有限公司,批号70110050),甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水为质谱纯,水为自制超纯水。

雄性SD大鼠40只,体质量(210±10)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心SPF级饲养室,室温(24±2)℃,相对湿度50%,12h/12h昼夜循环。本文所涉及的动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审核通过,批准号LL2021011302。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 大鼠适应性饲养7d,以随机数字表法分为TAC组24只,假手术组16只。24只TAC组大鼠进行手术造模<sup>[5-6]</sup>。麻醉大鼠后,脱除颈部、胸部鼠毛,四肢仰卧位固定于恒温手术台上,进行气管插管,连接小动物呼吸机以辅助呼吸(潮气量6~8 mL·kg<sup>-1</sup>,呼吸频率80次/min)。机械通气稳定后,于大鼠左侧第2和第3肋间切开皮肤,钝性分离肋间隙,暴露胸腺并用显微镊分离。随后定位主动脉弓,将缩窄线从主动脉弓下方穿过并从左颈总动脉与右无名动脉之间拉出,挑起主动脉弓,将自制缩窄垫针与主动脉弓平行放置,完全结扎后迅速取出垫针,经测量缩窄前后的主动脉弓外径变化,确定缩窄程度60%~65%。确认缩窄线稳固后,逐层关闭胸腔,缝合皮肤,继续通气10min,待动物恢复自主呼吸后拔出呼吸机,直至动物苏醒,回笼饲养。术后连续3d肌肉注射青霉素钠以防感染。假手术组采用相同的手术方法,但只穿线不缩窄主动脉弓。

在手术过程中,TAC组有4只大鼠因主动脉破裂或呼吸障碍死亡,20只大鼠在术后24h内存活并苏醒,随机分为TAC-30d组(术后饲养30d)和TAC-60d组(术后饲养60d),每组10只。16只假手术组大鼠在术后24h内均存活并苏醒,随机分为假手术30d组(术后饲养30d)和假手术60d组(术后饲养60d),每组8只。所有大鼠均予以常规饲料饲养,自由饮水。

**2.2 超声心动图检测** 大鼠仰卧位固定,脱除胸部鼠毛,暴露左胸廓与胸骨。M型超声测量左心室长轴切面,依据Teichholtz公式,计算左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(FS)、左室舒张末期内径

(LVIDd)、左室收缩末期内径(LVIDs)、左室后壁舒张末期厚度(LVPWd)、左室后壁收缩末期厚度(LVPWs)。

**2.3 样本采集** 所有大鼠于样本采集前12h禁食不禁水。打开大鼠腹腔,腹主动脉取血,待血液静置2h后于3000 r·min<sup>-1</sup>离心(4℃,15min,离心半径12cm,下同),提取上层血清,-80℃冰箱中保存,待检测。打开胸腔并取出心脏,于生理盐水中洗净残血,随后剥离左心室心肌组织,取组织100mg置于无添加的冻存管中,于-80℃冰箱中保存,用于LC-MS非靶向检测;剩余组织置于4%多聚甲醛固定液中,常温避光保存,用于组织病理染色检测。

**2.4 血清NT-proBNP和ATP含量检测** 使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清中的NT-proBNP和ATP的含量,严格按照试剂盒说明书规定步骤进行。为保持各组样本量一致性及排除不稳定样本,每组选取6个样本进行检测分析。

**2.5 心肌组织病理染色检测** 将心肌组织置于4%多聚甲醛固定液中固定24h,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度4μm,进行苏木素-伊红(HE)染色与Masson染色,光学显微镜下观察心肌组织病理变化。

## 2.6 LC-MS检测

**2.6.1 心肌组织预处理** 为保持各组样本量一致性及排除不稳定样本,每组选取6个样本进行检测。称取心肌组织25mg,加入提取液[甲醇-乙腈-水(2:2:1),含同位素标记内标混合物]500μL,35Hz研磨处理4min,超声冰浴5min,重复3次。-40℃条件下静置1h,于12000 r·min<sup>-1</sup>离心,取上清液进行LC-MS检测。

**2.6.2 色谱条件** 采用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1mm×100mm,1.7μm),流动相水(A,含25mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵和25mmol·L<sup>-1</sup>氨水)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~0.5min,95%B;0.5~7min,95%~65%B;7~8min,65%~40%B;8~9min,40%B;9~9.1min,40%~95%B;9.1~12min,95%B),样品盘温度4℃,进样量3μL。

**2.6.3 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式,正、负离子模式喷雾电压分别为3.6、-3.2kV,毛细管温度350℃,鞘气流量30arb,辅助气体流量25arb,全扫描分辨率6万,二级分辨率7500,采集范围m/z70~1050。

**2.6.4 数据处理与分析** 运用ProteoWizard将原始数据转为mzXML格式,使用R语言程序包(内核为

XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐,依据 BiotreeDB 2.1 数据库进行二级质谱定性匹配,根据二级质谱得分注释化合物。对处理后的数据矩阵进行主成分分析(PCA)与正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),绘制得分图,筛选差异代谢产物。

**2.6.5 差异代谢产物筛选** 组间差异代谢产物筛选基于 OPLS-DA 模型的变量投影重要性(VIP)值、*t* 检验结果及变异倍数(FC)分析,以 VIP 值>1.5、*P*<0.05、FC>1.20 或<0.83 为筛选条件,进一步查阅京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库,纳入有统计学意义的组间差异代谢产物。

**2.6.6 代谢通路分析** 运用 MetaboAnalyst 5.0 网络分析平台对组间差异代谢产物进行拓扑分析,以 Raw *P*<0.05 为筛选条件,参考通路影响值(pathway impact),纳入显著富集的代谢通路。

**2.7 统计学分析** 统计学分析采用 IBM SPSS

Statistics 24.0 软件,数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,若数据符合正态性和方差齐性,两组间比较采用 *t* 检验法,若不符合则采用 *t'* 检验,*P*<0.05 和 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 存活率** TAC-30 d 组术后第 1 周死亡 1 只,剩余 9 只,存活率 90%。TAC-60 d 组于术后第 1 周死亡 1 只、术后第 6 周死亡 1 只,剩余 8 只,存活率 80%。假手术 30 d 组与假手术 60 d 组无死亡,存活率均为 100%。

**3.2 超声心动图指标** 与假手术 30 d 组比较, TAC-30 d 组 LVIDs 显著下降(*P*<0.01),LVEF、FS、LVPWd、LVPWs 显著上升(*P*<0.01);与假手术 60 d 组比较, TAC-60 d 组的 LVEF 和 FS 显著下降(*P*<0.01),LVIDd、LVIDs、LVPWd 明显上升(*P*<0.05, *P*<0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠超声心动图指标的测定( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Determination of echocardiographic indicators in rats from each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	LVEF/%	FS/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVPWd/mm	LVPWs/mm
假手术 30 d 组	8	88.37±2.88	52.88±3.52	5.58±1.03	2.62±0.52	2.40±0.57	3.32±0.26
TAC-30 d 组	9	95.66±2.87 <sup>1)</sup>	67.78±7.24 <sup>1)</sup>	5.11±0.84	1.53±0.37 <sup>1)</sup>	3.42±0.36 <sup>1)</sup>	4.33±0.45 <sup>1)</sup>
假手术 60 d 组	8	89.38±3.81	55.12±5.43	5.50±0.72	2.46±0.50	2.77±0.32	3.75±0.29
TAC-60 d 组	8	69.87±7.88 <sup>3)</sup>	35.00±5.65 <sup>3)</sup>	7.06±0.59 <sup>3)</sup>	4.60±0.62 <sup>3)</sup>	3.28±0.35 <sup>2)</sup>	4.18±0.51

注:与假手术 30 d 组比较<sup>1)</sup>*P*<0.01;与假手术 60 d 组比较<sup>2)</sup>*P*<0.05, <sup>3)</sup>*P*<0.01(表 2 同)

**3.3 血清 NT-proBNP 和 ATP 含量** 与假手术 30 d 组比较, TAC-30 d 组的 NT-proBNP 含量显著上升、ATP 含量显著下降(*P*<0.01);与假手术 60 d 组比较, TAC-60 d 组的 NT-proBNP 含量显著上升、ATP 含量显著下降(*P*<0.01)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 NT-proBNP 和 ATP 含量的比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Expressions of NT-proBNP and ATP in rat serum of each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	NT-proBNP/ng·L <sup>-1</sup>	ATP/μg·L <sup>-1</sup>
假手术 30 d 组	313.12±47.69	529.48±97.54
TAC-30 d 组	386.75±20.25 <sup>1)</sup>	347.63±22.42 <sup>1)</sup>
假手术 60 d 组	308.05±39.18	504.67±62.88
TAC-60 d 组	422.52±24.42 <sup>3)</sup>	293.42±27.19 <sup>3)</sup>

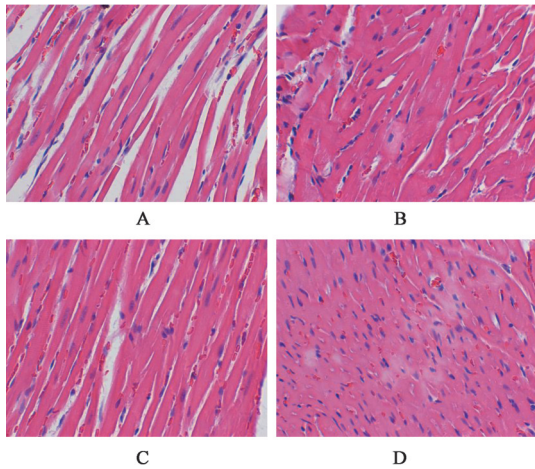
**3.4 心肌组织病理染色** 各组的心肌组织 HE 染色结果见图 1。假手术 30 d 组与假手术 60 d 组的心肌细胞排列整齐,细胞轮廓清晰,肌纤维、细胞核形态正常,未见明显心肌细胞水肿。TAC-30 d 组的心肌细胞排列紊乱,心肌细胞水肿。TAC-60 d 组的心肌细胞排列杂乱,肌纤维变性,可见空泡变性,心肌细

胞水肿明显增大,伴有部分细胞核消失,出现凝固性坏死。各组的心肌组织 Masson 染色结果见图 2。暗红色部分为肌纤维,蓝色部分为胶原纤维。假手术 30 d 组与假手术 60 d 组可见少量胶原纤维,并呈均匀分布。TAC-30 d 组可见明显胶原纤维增生并呈部分聚集。TAC-60 d 组可见大量胶原纤维沉积。

**3.5 LC-MS 总离子流图** LC-MS 分析所得正、负离子模式下各组的总离子流图见图 3。

**3.6 代谢轮廓** PCA 得分散点图显示,假手术 30 d 组与 TAC-30 d 组、假手术 60 d 组与 TAC-60 d 组在空间分布上显著分开,见增强出版附加材料。OPLS-DA 得分散点图显示,大部分样本点处于 95% 置信区间(圆形区域)内,假手术 30 d 组与 TAC-30 d 组、假手术 60 d 组与 TAC-60 d 组之间沿横坐标 *t*1 轴方向分离,呈左右对称分布趋势,见增强出版附加材料。各组样本点无交叉与重叠,组内聚集度良好,组间区分度显著。

**3.7 差异代谢产物** 通过对比假手术 30 d 组与



注: A. 假手术 30 d 组; B. TAC-30 d 组; C. 假手术 60 d 组; D. TAC-60 d 组(图 2 同)

图 1 各组大鼠心肌组织的病理观察(HE, ×400)

Fig. 1 Pathological observation of myocardial tissue in each group (HE, ×400)

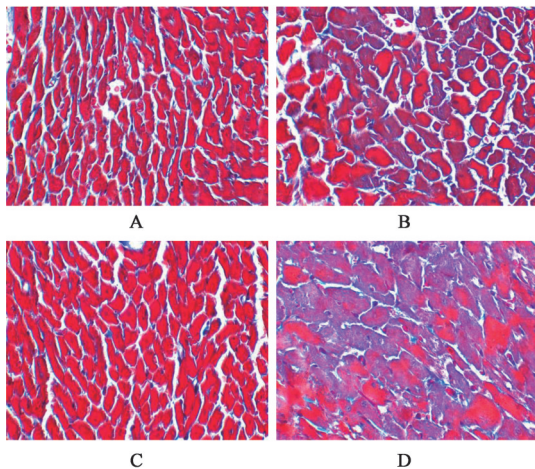


图 2 各组大鼠心肌组织的病理染色(Masson, ×400)

Fig. 2 Pathological staining of myocardial tissues in each group (Masson, ×400)

TAC-30 d 组, 筛选出了与 TAC-30 d 组密切关联的 15 种代谢产物, 即前列腺素 D<sub>2</sub>、16-甲基十七烷酸、邻苯二甲酸二丁酯、L-缬氨酸、尿嘧啶、4-羟基水苏碱、尿苷、D-木糖醇、胸苷、黄嘌呤核苷、水粉蕈素、山梨醇油酸酯、7-酮胆固醇、异粉防己碱、脱氧尿苷。通过对比假手术 60 d 组与 TAC-60 d 组, 筛选与 TAC-60 d 组密切关联的 21 种代谢产物, 即尿苷、D-木糖醇、胸苷、黄嘌呤核苷、水粉蕈素、7-酮胆固醇、山梨醇油酸酯、异粉防己碱、脱氧尿苷、棕榈油酸、葡萄糖-6-磷酸、4-羟甲基苯磺丁脲、环腺苷酸、β-D-半乳糖、麦芽糖、吡哆醇、1-蔗糖三糖、丁酰胺、磷脂酰胆碱 [18:1(11Z)/14:0]、嘌呤、溶血磷脂酰乙醇胺 [18:1(9Z)/0:0]。TAC-30 d 组与 TAC-60 d 组共有差异代谢产物 9 种。代谢产物信息见表增强出

版附加材料, 组间对比结果见表 3。

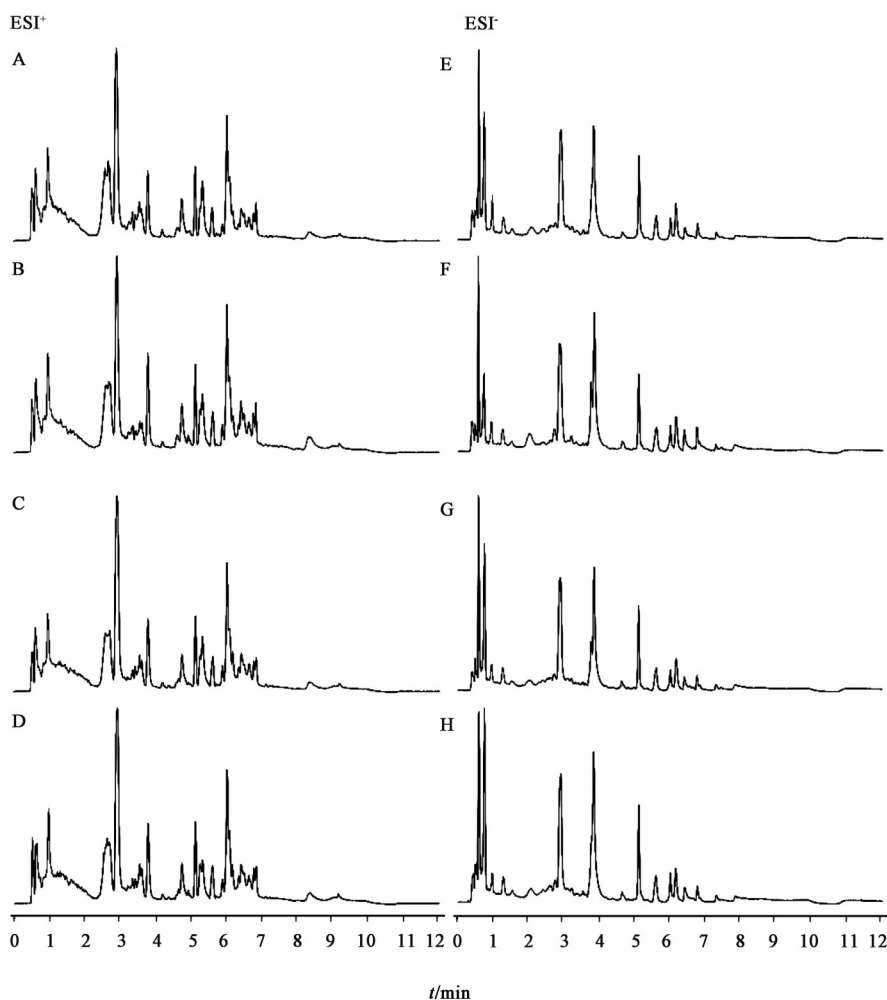
**3.8 代谢通路** 与 TAC-30 d 组关联的 15 种代谢产物共参与 9 条代谢通路, 其中嘧啶代谢通路、泛酸和辅酶 A 生物合成通路明显富集 (Raw  $P < 0.05$ )。与 TAC-60 d 组关联的 21 种代谢产物共参与 11 条代谢通路, 其中嘧啶代谢通路、淀粉和蔗糖代谢通路明显富集 (Raw  $P < 0.05$  且 pathway impact  $> 0$ )。见增强出版附加材料。

#### 4 讨论

TAC 模型的制备原理在于缩窄主动脉弓直径, 使血流阻力增大, 从而加重左心室后负荷, 渐行性发展为心力衰竭。TAC 术后即可增加心脏负荷并启动心肌肥厚进程, 至术后 30 d 时 LVPWd 与 LVPWs 上升、LVIDs 下降, 反映左心室室壁增厚、收缩末期室腔狭窄, 并伴随心肌细胞轻度水肿、胶原纤维增生, 已呈现典型的心肌肥厚特征。在压力超负荷早期阶段, 仍保有较强的心室排空能力, 若心室壁厚度尚可克服室壁应力, 心功能将维持在良好状态, 故 LVEF、FS 等心功能指标未见障碍, 甚至呈现代偿性上升趋势<sup>[7]</sup>。心室负荷增加和室壁张力改变, 心肌细胞受牵拉, 将刺激 NT-proBNP 合成与释放, 故此阶段伴随 NT-proBNP 含量上升。上述结果表明在 TAC 术后 30 d 时, 模型大鼠属代偿性心肌肥厚阶段, 代偿性肥厚在早期具有补偿作用, 利于增强心肌收缩力、降低心室壁张力与维持心输出量, 心脏收缩功能将代偿性增强<sup>[8]</sup>。

心脏是一个高耗能器官, 可利用多种底物产能以满足能量需求, 其中脂肪酸氧化是主要的能量来源, 氨基酸则供能甚少<sup>[9]</sup>。在 TAC 术后 30 d 的心肌肥厚阶段, 心肌失去其固有的组织构架, 伴随心肌细胞内的相对缺氧, 能量来源转变, 将出现能量失衡及产能底物转移<sup>[10]</sup>。泛酸和辅酶 A 生物合成通路对脂肪酸的氧化与合成具有重要调控作用, 此通路异常可导致 7-酮胆固醇、山梨醇油酸酯、16-甲基十七烷酸等脂质物质呈低水平表达, 反映脂类氧化障碍及利用率降低。包含 L-缬氨酸在内的支链氨基酸途径被过度激活, 加速分解以供能。心脏能量来源尚未向糖代谢明显偏移, 但存在明显的脂代谢障碍, 致使心脏产能减少, 底物利用并不能完全满足心脏需求, 故可见 ATP 相对缺乏<sup>[11]</sup>。且持续的支链氨基酸代谢异常, 将进一步恶化心功能与促进心室重构进程<sup>[12]</sup>。

TAC 术后 60 d 阶段, 胶原纤维大量沉积于心肌间质, 已出现严重心肌纤维化表现, 因此模型大鼠



注:A,E.假手术30 d组;B,F.TAC-30 d组;C,G.假手术60 d组;D,H.TAC-60 d组

图3 不同离子模式下各组大鼠心肌组织的总离子流

Fig. 3 Total ion chromatograms of myocardial tissues of rats from each group in different ion modes

心室壁未见进一步增厚。此阶段的左心室内径显著增大,反映过重的压力负荷已致心室异常扩张。LVEF、FS显著下降,心肌细胞大量水肿、凝固性坏死,心功能不全的生物标志物 NT-proBNP 达到峰值,表明模型大鼠的心脏收缩功能已受损伤,心功能严重障碍<sup>[13-14]</sup>。在 TAC 术后 30~60 d,持续的压力超负荷致使心室进行性扩大、心功能障碍,代偿反应逐步减弱,心肌顺应性降低,最终进入失代偿期<sup>[15]</sup>。此阶段的 LVEF 仍>40%,应是射血分数保留性心力衰竭,符合心脏后负荷增加所致慢性心力衰竭的病理特点<sup>[16]</sup>。

在 TAC 术后 60 d 的心力衰竭阶段,棕榈油酸、磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺等多种脂质物质呈低水平表达,反映脂质的吸收与利用障碍进一步恶化<sup>[17]</sup>。此阶段的糖代谢途径被激活,葡萄糖-6-磷酸、 $\beta$ -D-半乳糖、麦芽糖、1-蔗糖三糖等糖代谢物质均大幅度表达上调,蓄积于心肌细胞中。其中葡萄

糖-6-磷酸是葡萄糖经磷酸化生成的分子,作为共同中间体涉及多条糖代谢通路,既是磷酸戊糖途径的起始底物,亦是糖酵解途径的首个产物。麦芽糖是 2 个葡萄糖单位连接而成的二糖,可水解为 2 个分子葡萄糖为机体供能。葡萄糖-6-磷酸、麦芽糖参与淀粉和蔗糖代谢通路,此通路内物质可经系列酶促反应转化为葡萄糖,被机体吸收利用<sup>[18]</sup>。上述糖类物质与通路紊乱终将扰动葡萄糖的生成与利用。

心脏以 ATP 形式消耗大量能量,为使 ATP 有效适应衰竭心脏不断变化的能量需求,能量来源底物将进行性偏移。伴随脂肪酸代谢障碍加剧,TAC-60 d 组大鼠的能量来源已向葡萄糖供能转移,糖类物质成为替代能量底物。但糖类供能的增强并不能完全补偿脂肪酸的氧化利用障碍,并对 ATP 生成能力产生额外负担,故可见 ATP 呈现进一步低水平表达<sup>[4]</sup>。此阶段的底物偏移已不足以支撑心脏的收缩与泵血功能,心功能逐步衰竭,并处于慢性“能量

表3 不同组别差异代谢产物的组间对比

Table 3 Comparison of different metabolites between groups

No.	代谢产物	TAC-30 d组 vs 假手术 30 d组			TAC-60 d组 vs 假手术 60 d组		
		VIP 值	FC/倍	趋势	VIP 值	FC/倍	趋势
1	前列腺素 D <sub>2</sub>	1.54	0.64	↓ <sup>1)</sup>	-	-	-
2	16-甲基十七烷酸	2.22	0.65	↓ <sup>1)</sup>	-	-	-
3	邻苯二甲酸二丁酯	2.10	2.25	↑ <sup>1)</sup>	-	-	-
4	L-缬氨酸	1.88	1.34	↑ <sup>1)</sup>	-	-	-
5	尿嘧啶	1.65	3.46	↑ <sup>2)</sup>	-	-	-
6	4-羟基水苏碱	1.70	1.77	↑ <sup>1)</sup>	-	-	-
7	尿苷	2.03	1.51	↑ <sup>1)</sup>	2.14	1.87	↑ <sup>3)</sup>
8	D-木糖醇	2.12	0.53	↓ <sup>1)</sup>	1.97	0.49	↓ <sup>3)</sup>
9	胸苷	2.25	1.87	↑ <sup>2)</sup>	2.32	1.88	↑ <sup>4)</sup>
10	黄嘌呤核苷	2.38	0.46	↓ <sup>2)</sup>	1.86	0.59	↓ <sup>3)</sup>
11	水粉蕈素	2.49	0.36	↓ <sup>1)</sup>	1.94	0.34	↓ <sup>4)</sup>
12	7-酮胆固醇	2.01	0.67	↓ <sup>1)</sup>	1.82	0.52	↓ <sup>3)</sup>
13	山梨醇油酸酯	2.30	0.62	↓ <sup>1)</sup>	1.68	0.50	↓ <sup>3)</sup>
14	异粉防己碱	2.45	0.71	↓ <sup>2)</sup>	1.65	0.60	↓ <sup>3)</sup>
15	脱氧尿苷	2.13	1.45	↑ <sup>2)</sup>	2.01	1.48	↑ <sup>4)</sup>
16	棕榈油酸	-	-	-	2.09	0.50	↓ <sup>4)</sup>
17	葡萄糖-6-磷酸	-	-	-	2.00	4.59	↑ <sup>3)</sup>
18	4-羟基甲苯磺丁脲	-	-	-	2.06	0.43	↓ <sup>4)</sup>
19	环腺苷酸	-	-	-	1.72	1.52	↑ <sup>3)</sup>
20	β-D-半乳糖	-	-	-	1.80	2.37	↑ <sup>3)</sup>
21	麦芽糖	-	-	-	2.41	10.67	↑ <sup>3)</sup>
22	吡哆醇	-	-	-	2.18	0.21	↓ <sup>3)</sup>
23	1-蔗果三糖	-	-	-	2.41	22.02	↑ <sup>3)</sup>
24	丁酰胺	-	-	-	1.86	0.48	↓ <sup>3)</sup>
25	磷脂酰胆碱[18:1(11Z)/14:0]	-	-	-	2.39	0.53	↓ <sup>4)</sup>
26	嘌呤	-	-	-	2.14	0.38	↓ <sup>4)</sup>
27	溶血磷脂酰乙醇胺[18:1(9Z)/0:0]	-	-	-	1.55	0.59	↓ <sup>3)</sup>

注: ↑. 表达水平上调; ↓. 表达水平下调; -. 表达水平无明显变化; 与假手术 30 d 组比较<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; 与假手术 60 d 组比较<sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01

饥饿”状态,已发生“能量代谢重构”<sup>[19]</sup>。随着病程进展,长期脂肪酸代谢紊乱将导致脂毒性物质蓄积心肌,糖类供能亦难以维持心脏需求,终末阶段的底物进一步转移。

既往研究发现心肌缺血状态下的嘧啶代谢通路异常、尿苷等代谢产物表达水平上调<sup>[20]</sup>。本文研究亦证实嘧啶代谢通路异常并贯穿于“心肌肥厚-心力衰竭”的全过程,通路内的尿苷、脱氧尿苷、胸苷等代谢产物呈持续高水平表达。考虑原因可能是TAC术后改变了心脏血供状况,且心肌肥厚期与心力衰竭期均对血供需求增加,心肌缺血并累及一系

列心肌细胞损伤,从而产生多种降解产物<sup>[21]</sup>。嘧啶代谢还可通过多种路径调控心肌细胞能量代谢,通路异常亦佐证模型存在能量代谢失衡<sup>[22]</sup>。

综上所述,对SD大鼠进行TAC术,可较好地模拟压力超负荷所致的“心肌肥厚-心力衰竭”病理过程,术后4~5周适用于心肌肥厚研究,术后9周适用于心力衰竭研究,模型具有良好的稳定性与可靠性。将主动脉弓缩窄程度控制为60%以上,可避免缩窄过紧导致的急性肺水肿与急性心肌缺血,有效降低术中造模因素导致的死亡。但在TAC术中仍出现人为因素导致大鼠死亡的现象,如抽取垫针时

导致主动脉弓破裂、破坏纵隔而致气胸等,提示谨慎细致的操作是TAC模型成功建立的关键。TAC模型的术后生存率比较可观,死亡时间集中于术后1周内,且死亡大鼠均伴有张口呼吸等表现,考虑是术中损伤纵隔或肋间缝合不严所致,提示呼吸功能良好与否亦是影响TAC模型存活的重要因素。

本研究证实TAC术所建立大鼠模型属扩张性心力衰竭,病理特征体现为心室扩大、心功能障碍、心肌细胞凝固性坏死与心肌纤维化,与经典TAC小鼠模型存在一定共性,但SD大鼠失代偿阶段的出现时间晚于C57BL/6小鼠<sup>[23]</sup>。基于非靶向代谢组学揭示左心室负荷加重后的代谢产物变化规律,发现心肌肥厚发展为心力衰竭的病理过程中伴随一系列心脏产能底物转移,脂代谢障碍进行性加重,糖代谢过度激活并成为替代底物,反映心肌缺血状态与能量失衡的嘧啶代谢紊乱贯穿始终。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 刘宝辉,李明凯,罗晓星,等. 心力衰竭实验动物模型构建方法研究[J]. 中国心血管杂志, 2013, 18(3): 233-236.

[2] PATTEN R D, HALL-PORTER M R. Small animal models of heart failure: Development of novel therapies, past and present[J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(2): 138-144.

[3] 奚晓青,陈小真,马全鑫,等. 主动脉弓狭窄致大鼠慢性心力衰竭模型的建立及病理过程观察[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 35-40, 85.

[4] VAN-BILSEN M, SMEETS P J H, GILDE A J, et al. Metabolic remodelling of the failing heart: The cardiac burn-out syndrome?[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(2): 218-226.

[5] WU Y Y, QUAN C X, YANG Y, et al. Renalase improves pressure overload-induced heart failure in rats by regulating extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 signaling[J]. *Hypertens Res*, 2021, 44(5): 481-488.

[6] 胡骏豪,武晓静,顾文竹,等. 主动脉缩窄致大鼠左心功能不全对肺血管重构的影响及与BMP7表达的关系[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(14): 1385-1391.

[7] 陈洁娣,唐羽欣,胡婷婷,等. 主动脉弓缩窄大鼠心功能代偿期和失代偿期的评价[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(5): 670-675.

[8] LI B, CHI R F, QIN F Z, et al. Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: Association with oxidativestress[J]. *Exp Physiol*, 2016, 101(8): 1050-1063.

[9] TUOMAINEN T, TAVI P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 360(1): 12-18.

[10] 简维雄,肖隋熙,刘培,等. 自发性高血压大鼠左心室肥厚的代谢组学研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(4): 365-371.

[11] PETERZAN M A, LYGATE C A, NEUBAUER S, et al. Metabolic remodeling in hypertrophied and failing myocardium: A review[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(3): H597-H616.

[12] 付阳,李梦,孙小沛,等. 增强支链氨基酸氧化代谢改善心力衰竭患者心功能[J]. 临床心血管病杂志, 2020, 36(3): 219-222.

[13] 方明笋,金桦帅,张利榕,等. 小鼠非开胸式主动脉弓狭窄心衰模型的构建及评价[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 14-19.

[14] PAN Y, LI D, MA J, et al. NT-proBNP test with improved accuracy for the diagnosis of chronic heart failure[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(51): e9181.

[15] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7): 387-407.

[16] TAM M C, LEE R, CASCINO T M, et al. Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(2): 12.

[17] 闫君,郭思芳,刘莉,等. 基于尿液代谢组学比较厚朴温中汤合煎与单煎对脾胃虚寒大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 117-123.

[18] OLIVA M E, CREUS A, FERREIRA M R, et al. Dietary soya protein improves intra-myocardial lipid deposition and altered glucose metabolism in a hypertensive, dyslipidaemic, insulin-resistant rat model[J]. *Br J Nutr*, 2018, 119(2): 131-142.

[19] BERTERO E, MAACK C. Metabolic remodelling in heart failure[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 457-470.

[20] 庞博,王斌,舒振波,等. 慢性心功能衰竭患者尿液的代谢组学研究[J]. 分析化学, 2017, 45(8): 1165-1171.

[21] 李静,李亮,杨萍,等. 气虚证模型大鼠尿液代谢组学特征[J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 516-522.

[22] OIZEL K, TAIT-MULDER J, FERNANDEZ-DE-COSSIO-DIAZ J, et al. Formate induces a metabolic switch in nucleotide and energy metabolism[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 310.

[23] 谭伟江,李想,郑双,等. 压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 583-592.

[责任编辑 刘德文]