

· 药物代谢 ·

基于“方证对应”理论探讨主动脉弓缩窄致心力衰竭大鼠模型的中医证型与代谢标志物

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

[摘要] 目的:观察3种中药注射液对主动脉弓缩窄(TAC)致心力衰竭大鼠模型的疗效差异,基于“方证对应”理论探讨模型的中医证型,从代谢角度揭示方证的生物学基础。方法:对大鼠进行TAC术,造模成功将其后分为模型组、丹红注射液组(6.0 mL·kg⁻¹)、参麦注射液组(6.0 mL·kg⁻¹)、参附注射液组(6.0 mL·kg⁻¹)和曲美他嗪组(10 mg·kg⁻¹),另设立假手术组作对照。药物干预15 d后,对各组进行超声心动图、血清氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)与心肌组织病理染色检测,对比疗效以遴选有效注射液;运用比色法检测有效注射液干预后的血清糖脂代谢指标,利用超高效液相色谱-质谱法观察心肌组织代谢产物与关联代谢通路。结果:与假手术组比较,模型组左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(FS)显著下降($P<0.01$),左室舒张末期内径(LVIDd)、左室收缩末期内径(LVIDs)和NT-proBNP水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,丹红注射液组LVEF和FS显著上升($P<0.01$),LVIDd、LVIDs、NT-proBNP水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);参附注射液组的NT-proBNP水平明显下降($P<0.05$);参麦注射液组的LVIDd明显上升($P<0.05$),NT-proBNP水平显著上升($P<0.01$);曲美他嗪组LVEF和FS显著上升($P<0.01$),LVIDs和NT-proBNP水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。丹红注射液组与曲美他嗪组的血清葡萄糖、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇水平明显回调($P<0.05$, $P<0.01$);丹红注射液组的9种心肌产物回调,涉及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,乙醛酸和二羧酸酯代谢,甘油磷脂代谢;曲美他嗪组的10种心肌产物回调,涉及甘油磷脂代谢。结论:丹红注射液对TAC致心力衰竭模型的疗效显著且优于参附注射液与参麦注射液,推测该模型与心血瘀阻证密切相关;丹红注射液干预模型的生物学机制涉及调节糖脂代谢、氨基酸代谢、丁酸代谢紊乱。

[关键词] 主动脉弓缩窄(TAC); 心力衰竭(HF); 方证对应; 代谢组学; 生物标志物; 超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS); 氨基酸

[中图分类号] R22;R28;R96;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)16-0130-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211951

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210927.2330.008.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 11:57

Exploration on Syndrome Types and Metabolic Markers of Rat Model with Heart Failure Caused by Transverse Aortic Constriction Based on Theory of Correspondence of Prescription and Syndrome

ZHONG Senjie, XIONG Xiajun, ZHANG Qian, HU Siyuan*, YANG Meng, HUANG Shumin,
FANG Ge, WANG Ziyi, LI Lin, HU Zhixi*
(Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis,
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the difference in the efficacy of three kinds of traditional Chinese

[收稿日期] 2021-08-20

[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);广东省重点领域研发项目(2020B1111100001);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] * 胡思远,博士,讲师,从事心血管疾病证本质与诊治规律研究,E-mail:6484808@qq.com;

* 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

medicine (TCM) injections on rat model of heart failure induced by transverse aortic constriction (TAC), explore the TCM syndrome of the model based on the theory of correspondence of prescription and syndrome, and reveal the biological basis of prescription-syndrome from the perspective of metabolism. **Method:** Rats were treated with TAC for modeling and were divided into Shenmai injection group ($6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), model group, Danhong injection group ($6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), Shenfu injection group ($6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) and trimetazidine group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and sham operation group was set up as control. After drug intervention for 15 days, echocardiography, serum *N*-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and myocardial histopathological staining were performed for each group, so as to compare the efficacy to select the effective injection. Colorimetry was used to detect the serum glucolipid metabolism after the intervention of the effective injection, and ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry was used to observe the metabolites and related metabolic pathways in myocardial tissue. **Result:** Compared with the sham operation group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (FS) in the model group decreased ($P < 0.01$), while the left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd), left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs) and NT-proBNP level increased ($P < 0.01$). Compared with model group, LVEF and FS increased ($P < 0.01$), LVIDd, LVIDs and NT-proBNP level decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in Danhong injection group, NT-proBNP level in Shenfu injection group decreased ($P < 0.05$), LVIDd and NT-proBNP level increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in Shenmai injection group, in trimetazidine group, LVEF and FS increased ($P < 0.01$), while LVIDs and NT-proBNP level decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Serum glucose, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels in Danhong injection group and trimetazidine group were adjusted by callbacks ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There were the callback of 9 myocardial metabolites in Danhong injection group, including glycine, serine and threonine metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, glycerol phospholipid metabolism. There were the callback of 10 myocardial metabolites in trimetazidine group, including glycerol phospholipid metabolism. **Conclusion:** The efficacy of Danhong injection on heart failure model induced by TAC is significant and superior to Shenfu injection and Shenmai injection, suggesting that the model is closely related to heart-blood stasis. The biological mechanism of Danhong injection interfering with the model involves regulating the metabolic disorder of lipid, glucose, amino acid and butyric acid.

[Keywords] transverse aortic constriction (TAC); heart failure (HF); correspondence of prescription and syndrome; metabolomics; biomarkers; ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS); amino acids

心力衰竭(HF)动物模型可较好地模拟人类HF的病理过程与特征,人类HF存在不同的中医证候分型,HF动物模型亦应有证型的差异。本课题组推测证型差异与造模方法有关。前期基于“方证对应”理论研究发现,益气养阴法对盐敏感性高血压HF大鼠疗效显著且优于益气温阳法、益气温阳法对阿霉素诱导心肌病HF大鼠疗效显著且优于益气养阴法、活血化瘀法对心肌梗死HF大鼠疗效显著且优于益气养阴法与益气温阳法^[1-4]。前期研究结果显示,不同造模方法建立的HF模型存在中医证型差异,通过“以方测证”法可实现证型的有效辨析。

主动脉弓缩窄(TAC)可增加心脏后负荷,诱发左心室重构而逐步导致压力超负荷型HF,TAC模型是HF研究的理想材料^[5-6]。前期研究已成功建立

TAC大鼠模型,并证实其病理过程中伴随多层次的代谢产物紊乱^[7]。本研究基于“方证对应”理论,以TAC术致HF大鼠模型为研究对象,分析参麦注射液(益气养阴)、丹红注射液(活血化瘀)和参附注射液(益气温阳)干预后的疗效反应,遴选有效注射液,从方药功效逆向推测模型的中医证型;同时,运用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)观察模型及遴选的中药注射液干预后的代谢产物变化规律,以阐明方证的生物学基础,为构建HF病证结合模型及其中药注射液的合理运用提供参考依据。

1 材料

Vanquish型超高效液相仪和Q Exactive HF-X型质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),S2N型超声诊断仪(深圳市开立科技有限公司),MB-530

型酶标仪(深圳市汇松科技发展有限公司), RWD407型呼吸机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号G28032936),葡萄糖(Glu)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20210406137、20210531、20210531、20210528、20210529),参附注射液[华润三九(雅安)药业有限公司,批号201106AK05,10 mL/支],丹红注射液(山东丹红制药有限公司,批号20112012,20 mL/支),参麦注射液(正大青春宝药业有限公司,批号2011218,50 mL/瓶),盐酸曲美他嗪片(瑞阳制药股份有限公司,批号20121706,20 mg/片),注射用青霉素钠(山东鲁抗医药集团有限公司,批号43200909,0.48 g/瓶),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),水为自制超纯水,甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水为质谱纯。

清洁级雄性SD大鼠80只,体质量(210±10)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,在湖南中医药大学实验动物中心SPF级实验室内饲养。本文涉及的动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号LL2021011302。

2 方法

2.1 模型制备 80只大鼠常规喂养7d,随机分为假手术组10只和TAC组70只。TAC模型的制备方法参考文献[7]。麻醉大鼠并固定四肢,仰卧在恒温手术台,脱除前胸部及颈部毛发,表皮消毒。切开颈部表皮,暴露气管并插管,接入呼吸机辅助呼吸。切开胸部表皮,钝性分离第2、3肋间隙,分离胸腺以充分暴露主动脉弓。定位左颈总动脉与右无名动脉间的主动脉弓处,缩窄线穿过下方并提起,与缩窄垫针平行,结扎后抽出垫针,用高精度游标卡尺测量,缩窄60%~65%。逐层缝合肋间隙、表皮,脱离呼吸机。术后3d注射青霉素钠。假手术组只穿线不缩窄,其余步骤同TAC组。TAC术后9周,检测存活大鼠的超声心动图与血清NT-proBNP含量。HF模型的验证条件参考文献[7]。与假手术组比较,以TAC组左室收缩末期内径(LVIDs)、左室舒张末期内径(LVIDd)显著上升视为心室异常扩大。与假手术组比较,以TAC组左室射血分数(LVEF)与左室短轴缩短率(FS)显著下降,以及NT-proBNP

显著上升视为心功能失代偿性障碍。均满足以上条件,评定为HF模型复制成功。

2.2 分组与给药 TAC组成模大鼠按随机数字表法分为模型组、丹红注射液组、参麦注射液组、参附注射液组和曲美他嗪组。换算人与动物等效剂量,确定给药方式。①丹红注射液组、参麦注射液组、参附注射液组:腹腔注射相应的中药注射液,单次剂量 $6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,并按 $4.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃生理盐水;②曲美他嗪组:将盐酸曲美他嗪片溶于生理盐水中,按剂量 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,并按剂量 $6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射灭菌注射用水;③假手术组、模型组:按剂量 $4.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃生理盐水,按 $6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射灭菌注射用水。因选用的中药注射液不宜久用,参照本课题组前期给药方法,确定给药时间 $15 \text{ d}^{[2-4]}$ 。

2.3 疗效评价 药物干预15d后再次进行超声心动图检测,随后对所有大鼠进行样本采集。打开腹腔,腹主动脉取血5 mL,离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,15 min,离心半径12 cm)后保存上清液。每组选用6个稳定样本,各提取血清200 μL ,利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测NT-proBNP含量,根据试剂盒说明书要求操作。取血完毕后立即打开胸腔,取出完整心脏,洗去残留血液,剪取左室组织200 mg低温保存,待代谢组学分析;其余组织通过4%多聚甲醛溶液固定,待苏木素-伊红(HE)染色和Masson染色。结合超声心动图、血清NT-proBNP水平和心肌组织病理检测结果,对比各注射液疗效,以备后续研究。

2.4 糖脂代谢指标检测 选取假手术组、模型组、丹红注射液组、曲美他嗪组的血清样本,每组各6个样本。采用酶标仪比色法检测血清Glu、LDL-C、HDL-C、TG和TC含量,按照测试盒说明书操作。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 样本处理 选取假手术组、模型组、丹红注射液组、曲美他嗪组大鼠的左心室组织进行分析,每组6个样本。添加提取液[甲醇-乙腈-水(2:2:1)]500 μL 至样本中,研磨4 min,超声处理5 min(功率40 kHz,频率480 W),研磨与超声步骤重复3次。低温静置60 min,离心($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,15 min,离心半径12 cm)后取上清,待测。

2.5.2 检测条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相选择水(A,含25 mmol·L⁻¹乙酸铵和25 mmol·L⁻¹氨水)-乙腈(B)进行梯度洗脱(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)^[7],柱温

25 °C,流速0.5 mL·min⁻¹,进样量3 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子扫描,离子源温度350 °C,去溶剂气温度350 °C,毛细管温度350 °C,碰撞能量为10、30、60 eV,扫描范围 *m/z* 70~1 050。

2.5.3 数据处理 上机分析后获得原始数据,转换mzXML格式,R程序包进行峰处理,得可用于分析的数据矩阵。基于BiotreeDB(V2.1)质谱数据库进行一级、二级质谱代谢产物定性注释,二级质谱匹配Cutoff值0.3。将已注释代谢产物输入京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库中,匹配ID号。

2.5.4 差异代谢产物筛选 对数据进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),获得散点得分图,直观展示组间代谢表型差异。依据变量重要性投影(VIP)值,以VIP值>1.0作为纳入条件,进一步采用*t*检验以验证差异是否具有显著性。组间比较方式有①模型组与假手术组;②丹红注射液组与模型组;③曲美他嗪组与模型组。以①筛选的差异代谢产物为潜在靶标,观察②和③的回调情况,最终纳入①与②、①与③的共同差异代谢产物。

2.5.5 代谢通路分析 将丹红注射液组与曲美他嗪组显著回调的代谢产物输入MetaboAnalyst 5.0软件进行通路拓扑分析,将通路影响值(pathway impact)>0.1的代谢通路视为潜在的药物靶标通路。

表1 各组大鼠超声心动图检测指标的测定($\bar{x}\pm s$)

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

组别	<i>n</i>	剂量	LVEF/%	FS/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术组	9		89.11±5.15	55.00±7.44	5.67±0.35	2.55±0.52
模型组	10		66.50±5.81 ¹⁾	32.40±3.89 ¹⁾	6.65±0.48 ¹⁾	4.51±0.43 ¹⁾
丹红注射液组	10	6.0 mL·kg ⁻¹	82.30±2.54 ³⁾	45.40±2.71 ³⁾	6.00±0.68 ²⁾	3.28±0.49 ³⁾
参麦注射液组	10	6.0 mL·kg ⁻¹	66.80±6.12	33.80±5.02	7.24±0.71 ²⁾	4.88±0.58
参附注射液组	9	6.0 mL·kg ⁻¹	69.77±4.17	34.66±3.35	6.86±0.56	4.48±0.39
曲美他嗪组	9	10 mg·kg ⁻¹	77.66±6.89 ³⁾	41.55±6.48 ³⁾	6.36±0.85	3.68±0.62 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾*P*<0.01;与模型组比较²⁾*P*<0.05,³⁾*P*<0.01

3.3 血清NT-proBNP表达 假手术组、模型组、丹红注射液组、参麦注射液组、参附注射液组、曲美他嗪组血清NT-proBNP的质量浓度分别为(198.46±28.28)、(381.45±65.03)、(272.80±45.27)、(924.67±152.22)、(298.64±33.28)、(302.63±43.60) ng·L⁻¹。结果发现与假手术组比较,模型组血清NT-proBNP水平显著上升(*P*<0.01)。与模型组比较,丹红注射液组、参附注射液组和曲美他嗪组血清NT-proBNP水平明显下降(*P*<0.05,*P*<0.01);参麦注射液组显著上升(*P*<0.01)。

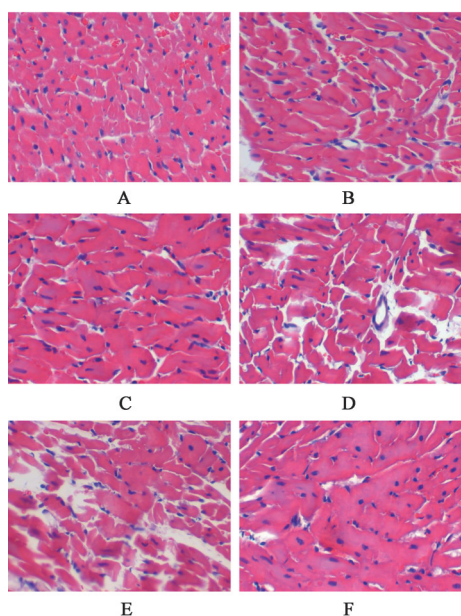
2.6 统计学分析 运用SPSS 24.0,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较用*t*检验,多组间比较用单因素方差分析。*P*<0.05和*P*<0.01表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠存活情况 TAC组在手术过程中,因主动脉破裂、纵隔或肺部损伤,导致死亡12只;术后9周内,因呼吸障碍、心功能衰竭,导致死亡9只。手术后9周,TAC组最终剩余49只,存活大鼠满足成模条件,依据随机数字表法分为模型组(10只)、丹红注射液组(10只)、参麦注射液组(10只)、参附注射液组(10只)和曲美他嗪组(9只)。假手术组手术过程中,因主动脉破裂意外死亡1只,剩余9只。经药物干预15 d后,参附注射液组因为心功能衰竭死亡1只,其余组别无死亡。

3.2 超声心动图分析 与假手术组比较,模型组的LVEF和FS显著下降(*P*<0.01),LVIDd和LVIDs显著上升(*P*<0.01)。与模型组比较,丹红注射液组的LVEF和FS显著上升(*P*<0.01),LVIDd和LVIDs明显下降(*P*<0.05,*P*<0.01);参麦注射液组的LVIDd明显上升(*P*<0.05);曲美他嗪组LVEF和FS显著上升(*P*<0.01),LVIDs显著下降(*P*<0.01);参附注射液组各项指标的差异则均无统计学意义。详细实验数据见表1。

3.4 心肌组织病理观察 假手术组心肌细胞排列整齐,细胞核形态正常,未见水肿、坏死等病理现象,无明显胶原纤维沉积或增生。模型组心肌细胞排列紊乱,心肌细胞增大与水肿,肌纤维变性,细胞核形态异常且部分消失,出现凝固性坏死,胶原纤维明显沉积。与模型组比较,参麦注射液组与参附注射液组无明显改善,心肌细胞排列仍存在紊乱、断裂,参麦注射液组胶原纤维沉积加重;丹红注射液组与曲美他嗪组的心肌细胞排列趋向整齐,胶原纤维沉积减轻,仅见少量胶原纤维。见图1和图2。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 丹红注射液组; D. 参麦注射液组; E. 参附注射液组; F. 曲美他嗪组(图2同)

图1 各组大鼠心肌组织形态结构观察(HE, ×400)

Fig. 1 Morphology and structure of myocardial tissues in each group (HE, ×400)

3.5 血清糖脂代谢指标 与假手术组比较,模型组Glu、LDL-C水平显著上升($P<0.01$), HDL-C水平明显下降($P<0.05$)。与模型组比较,丹红注射液组的

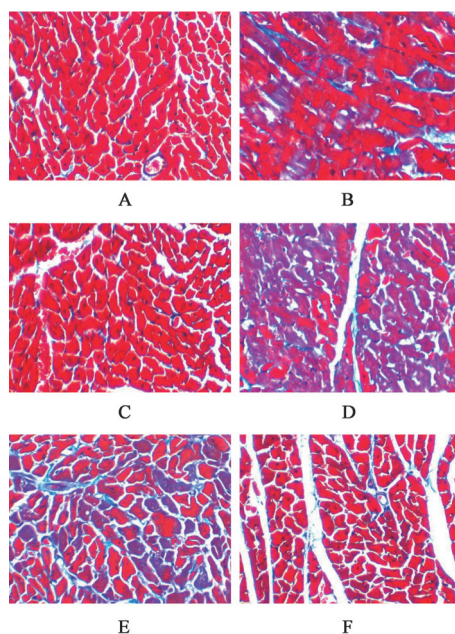


图2 各组大鼠心肌组织纤维化情况(Masson, ×400)

Fig. 2 Myocardial tissue fibrosis of rats from each group (Masson, ×400)

Glu、LDL-C和TG水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$), HDL-C水平显著上升($P<0.01$);曲美他嗪组Glu和LDL-C水平显著下降($P<0.01$), HDL-C水平明显上升($P<0.05$)。见表2。

表2 丹红注射液与盐酸曲美他嗪片对TAC大鼠糖脂代谢指标的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Danhong injection and trimetazidine hydrochloride tablets on glucolipid metabolism in TAC rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量	Glu	HDL-C	LDL-C	TG	TC
假手术组		6.23±0.31	1.39±0.34	0.39±0.07	0.99±0.19	2.53±0.26
模型组		9.96±0.15 ²⁾	0.96±0.10 ¹⁾	0.73±0.09 ²⁾	0.98±0.16	2.29±0.27
丹红注射液组	6.0 mL·kg ⁻¹	6.38±0.42 ⁴⁾	1.25±0.07 ⁴⁾	0.53±0.14 ³⁾	0.54±0.09 ⁴⁾	2.18±0.12
曲美他嗪组	10 mg·kg ⁻¹	8.22±0.89 ⁴⁾	1.21±0.17 ³⁾	0.51±0.11 ⁴⁾	0.85±0.11	2.20±0.19

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

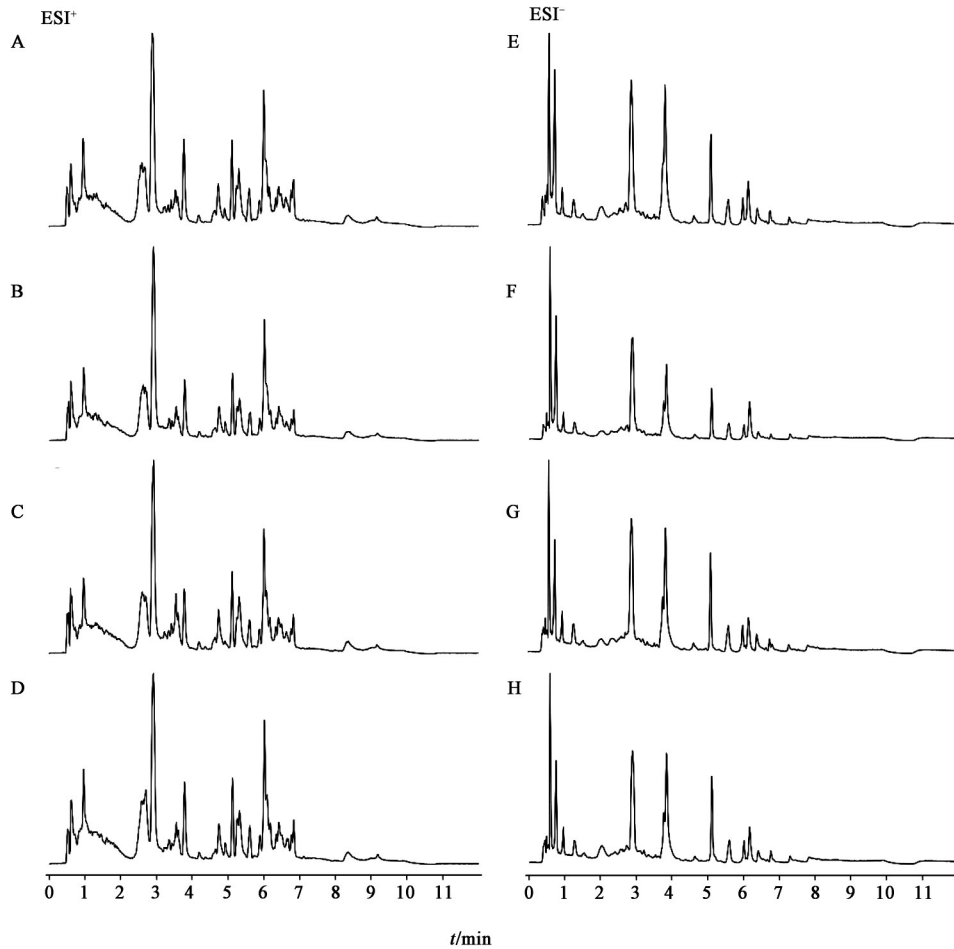
3.6 非靶向代谢组学分析

3.6.1 总离子流图 各组大鼠心肌组织的总离子流图见图3。

3.6.2 代谢模式分析 OPLS-DA散点得分图详见图4,图中每个散点代表1个相应样本。结果显示,各组样本在空间分布上未见交叉和重叠,组间区分度显著。

3.6.3 组间差异代谢产物 以模型组出现紊乱的代谢产物为潜在靶标,筛选丹红注射液和盐酸曲美他嗪片干预后显著回调的代谢产物。与模型组比较,丹红注射液组4-羟基丁酸、肌酸酐、三甲基丙基吡嗪、甘氨酸、邻苯二甲酸、三酰甘油[15:0/18:3(6Z, 9Z, 12Z)/24:1(15Z)]、磷脂酰乙醇胺[14:1(9Z)/14:0]、三磷酸盐、4-羟基苯甲醛9种产物明显

回调(VIP值>1.0, $P<0.05$);磷脂酰胆碱[20:4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/20:3(8Z, 11Z, 14Z)]、L-谷氨酸、L-天冬氨酸、瓜氨酸、 γ -氨基丁酸、2-甲氧基-3-甲基吡嗪、N-乙酰基-L-天冬氨酸7种产物呈回调趋势(VIP值>1.0)。与模型组比较,曲美他嗪组的磷脂酰乙醇胺[14:1(9Z)/14:0]、三磷酸盐、4-羟基苯甲醛、2-甲氧基-3-甲基吡嗪、N-乙酰基-L-天冬氨酸、N-乙酰谷氨酸、鸟嘌呤核苷、3-脱氢肉碱、吡啶-3-羧酸、 α -生育酚10种产物明显回调(VIP值>1.0, $P<0.05$);甘氨酸、邻苯二甲酸、三酰甘油[15:0/18:3(6Z, 9Z, 12Z)/24:1(15Z)]、磷脂酰胆碱[20:4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/20:3(8Z, 11Z, 14Z)]、L-谷氨酸、L-天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、瓜氨酸8种产物呈回调趋势(VIP值>1.0)。见表3。



注:A,E.假手术组;B,F.模型组;C,G.丹红注射液组;D,H.曲美他嗪组

图3 不同离子模式下各组大鼠心肌组织的UPLC-MS/MS总离子流

Fig. 3 UPLC-MS/MS total ion chromatograms of myocardial tissues of rats in each group under different ion modes

3.6.4 代谢通路 丹红注射液组明显回调的9种代谢产物共参与了8条代谢通路,其中甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路,乙醛酸和二羧酸酯代谢通路,甘油磷脂代谢通路的pathway impact显著。曲美他嗪组显著回调的10种代谢产物共参与了5条代谢通路,其中甘油磷脂代谢通路的pathway impact显著。见图5。

4 讨论

中药方剂与中医证型间存在必然的对应关系,方证相符才可更好地发挥疗效,若方证不符,轻则疗效不显,重则恶化病情,此即“方证对应”。基于“方证对应”理论衍生出“以方测证”法,即对成熟的疾病模型,不模拟导致“证”形成的因素,以方药疗效逆向推测模型的证候属性,从疾病中探索中医证型^[8]。针对于方药多效性、设计排他性等常见研究瓶颈,本课题组前期已论述“以方测证”法的研究思路,本研究在前期基础上进一步优化^[8-9]:①结合HF病机特点,以“气、血、阴、阳”为纲,参照HF基本中

医治法,确立益阴、温阳、活血三类代表性方药,相互对照以增强排他性^[10];②选用药简力专、浓度稳定的中药注射液,疗效确切以提升结果说服力,并可避免传统汤剂因药物剂量、质量差别而引起的误差;③辅以高通量的代谢组学技术,从生物学角度丰富方证的评价指标。

TAC可模拟压力超负荷所致的“代偿性心肌肥厚-失代偿性HF”病理过程。至失代偿阶段,模型的主要病理特征体现为心室扩张与心功能障碍^[11]。同时伴有心肌细胞凝固性坏死,病变心肌间质内可见胶原纤维沉积,并将围绕心肌细胞而形成纤维网,限制心肌细胞的正常功能。本研究发现,HF模型大鼠经参麦注射液与参附注射液干预后,各项超声心动图指标、心肌组织形态均未显著改善,参麦注射液组的LVIDd和NT-proBNP水平进一步恶化,考虑是舒张功能障碍与心室异常扩张的加剧进展所致。丹红注射液可有效改善模型的各项心功能指标,恢复心肌组织结构,疗效显著且具有多效应

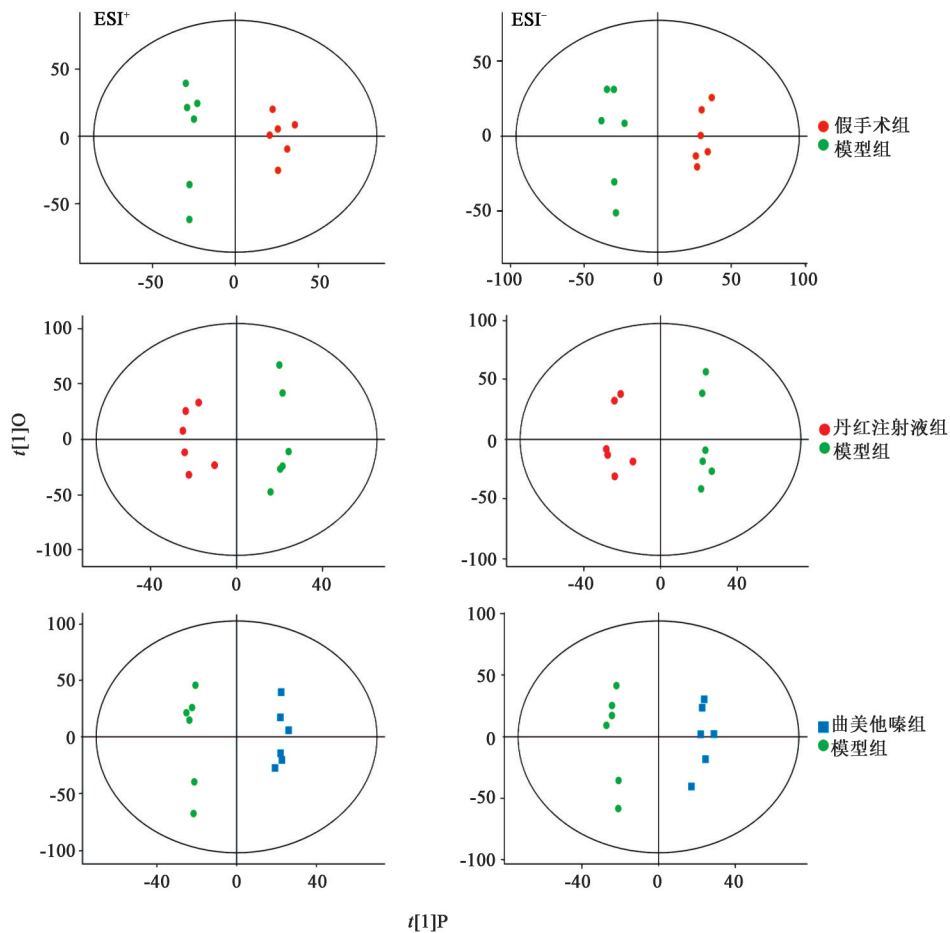


图4 不同离子模式下各组大鼠心肌组织的OPLS-DA得分

Fig. 4 OPLS-DA score plots of myocardial tissues of rats in each group under different ion modes

性。研究证实益气养阴法与益气温阳法对模型无显著治疗作用,且益气养阴法恶化部分指标,活血化瘀法则展现出良好疗效。基于“方证对应”理论,推测该模型不属于心气阴虚证与心阳气虚证,而是与心血瘀阻证密切相关。

NT-proBNP在心室扩张或室壁张力增加时表达上调,从而解释以心功能障碍或心肌损伤为主的病变,是HF诊断及疗效评估的可靠标志物^[12]。本研究发现,丹红注射液可有效下调模型NT-proBNP表达,其机制可能是药物减轻心室负荷与缓解心室扩张,进而减少刺激心室心肌细胞分泌NT-proBNP。值得注意的是,肾脏是NT-proBNP的唯一清除途径,其表达水平亦受肾功能影响。参附注射液在未改善各项心脏功能与结构指标的情况下,反而下调NT-proBNP表达,考虑可能与药物改变肾代谢功能相关,具体机制有待深入研究。各组NT-proBNP水平变化规律未与超声心动图指标、组织病理染色结果完全契合,反映单一NT-proBNP指标对模型及方药缺乏特异性,联合NT-proBNP与超声心动图指

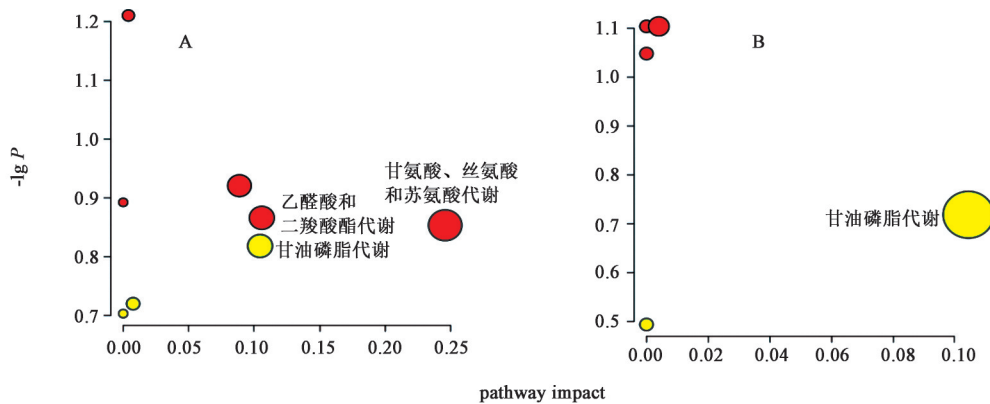
标将更具说服力^[13]。

心脏为高耗能器官,具有高效代谢机制,需利用多种能量底物以满足耗能,其中脂肪酸是最重要的底物,约60%~90%能量源自脂肪酸氧化。在HF病理过程中,伴随脂质过氧化反应与利用率降低,故可见模型组的TG、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱等系列脂类物质紊乱,促进脂肪氧化为能量的肉碱物质亦呈低水平表达,这将致使能量来源缺乏及脂毒性物质堆积心肌^[14]。HF时心肌相对缺氧,脂肪酸成为低效的产能底物,为保证心脏能量的有效供应,产能底物将发生偏移^[15]。传统观点认为,产能底物将由脂肪酸向Glu转移,Glu代谢呈进行性增强趋势,糖酵解等途径加速,但这一底物转化规律尚未达成共识^[16]。本文研究证实,HF大鼠存在糖脂代谢紊乱,另发现甘氨酸、L-谷氨酸、L-天冬氨酸、瓜氨酸等氨基酸类物质及其衍生物呈紊乱状态,考虑是机体需动员氨基酸代谢以加强产能所致,与既往研究存在共性^[17]。即除Glu外,氨基酸亦成为替代能量来源,这一结论丰富了HF能量失衡后的能量

表3 丹红注射液与盐酸曲美他嗪片对TAC大鼠心肌组织代谢产物的调节作用

Table 3 Regulation effect of Danhong injection and trimetazidine hydrochloride tablets on metabolites in myocardial tissues of TAC rats

代谢产物	KEGG ID	t/s	m/z	模型组-假手术组		丹红注射液组-模型组		曲美他嗪组-模型组	
				VIP值	P	VIP值	P	VIP值	P
4-羟基丁酸	C01770	399.01	105.11	1.55	<0.05	2.22	<0.05	-	-
肌酸酐	C00791	361.04	112.05	1.67	<0.01	2.04	<0.01	-	-
三甲基丙基吡嗪	-	606.51	165.13	1.56	<0.05	1.85	<0.05	-	-
甘氨酸	C00037	378.30	76.03	1.53	<0.05	1.81	<0.05	1.16	>0.05
邻苯二甲酸	C01606	425.70	165.01	1.51	<0.05	1.67	<0.05	1.32	>0.05
三酰甘油[15:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/24:1(15Z)]	-	242.56	926.52	1.51	<0.05	2.18	<0.05	1.87	>0.05
磷脂酰乙醇胺[14:1(9Z)/14:0]	C00350	42.66	634.44	2.21	<0.05	2.46	<0.05	2.53	<0.05
三磷酸盐	C02174	599.19	253.92	1.83	<0.05	2.21	<0.01	1.95	<0.05
4-羟基苯甲醛	C00633	366.72	121.02	1.27	<0.05	1.84	<0.05	1.85	<0.05
磷脂酰胆碱[20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)]	C00157	63.06	832.58	1.62	<0.05	1.81	>0.05	1.63	>0.05
L-谷氨酸	C00025	406.68	146.04	1.76	<0.01	1.20	>0.05	1.64	>0.05
L-天冬氨酸	C00049	463.46	132.02	1.45	<0.05	1.36	>0.05	1.48	>0.05
瓜氨酸	C00327	406.87	176.10	1.73	<0.05	1.01	>0.05	1.53	>0.05
γ-氨基丁酸	C00334	406.56	102.05	1.77	<0.01	1.09	>0.05	1.50	>0.05
2-甲氧基-3-甲基吡嗪	-	222.49	125.07	1.66	<0.05	1.82	>0.05	2.31	<0.01
N-乙酰基-L-天冬氨酸	C01044	408.11	160.02	1.56	<0.05	1.22	>0.05	2.03	<0.05
N-乙酰谷氨酸	C00624	413.59	188.05	1.58	<0.05	-	-	1.88	<0.05
鸟嘌呤核苷	C00387	276.80	284.09	1.68	<0.05	-	-	1.98	<0.05
3-脱氢肉碱	C02636	348.41	160.09	2.01	<0.01	-	-	2.02	<0.05
吡啶-3-羧酸	C19837	559.53	162.05	1.46	<0.05	-	-	1.78	<0.05
α-生育酚	C02477	30.77	429.37	1.69	<0.05	-	-	2.24	<0.05



注:A. 丹红注射液的潜在靶标通路;B. 盐酸曲美他嗪片的潜在靶标通路

图5 丹红注射液与盐酸曲美他嗪片干预TAC大鼠后的代谢通路分析

Fig. 5 Analysis of metabolic pathways after TAC rats intervened by Danhong injection and trimetazidine hydrochloride tablets

转化理论。

心脏产能底物代谢灵活性降低是HF能量代谢障碍的主要特征,促使产能底物正常化则是HF治疗的关键靶标^[18]。底物转变是多环节的,单向调节某一类底物存在明显局限,将致心脏代谢灵活性进

一步丧失与毒性中间产物蓄积,故全面调控底物代谢以恢复心脏能量有效供给,方为最具前景的治疗模式^[19]。既往研究证实,曲美他嗪具有抑制脂肪酸、促进Glu代谢的多靶向作用,是优化能量代谢底物的理想药物^[20-21]。本研究发现丹红注射液与曲美

他嗪的生物学疗效存在共性,既可同时回调脂质代谢与Glu代谢紊乱,调控甘油磷脂代谢通路,氨基酸产能增强的代谢状态亦得到不同程度改善。丹红注射液对代谢产物展现出多靶点、多途径的干预效应,药物干预后的多种产物水平趋于正常方向,这将有助于增强衰竭心脏的能量产生与供给,从而延缓心室重构,改善心脏功能。HF后的心脏能量转化与产能底物转移在本研究中得到再次验证,此外还发现多种涉及能量代谢的产物紊乱。其中 γ -氨基丁酸为抑制性神经递质,4-羟基丁酸是 γ -氨基丁酸的前体。 γ -氨基丁酸可在三羧酸循环中增强己糖激酶活性,进一步加速Glu代谢,并可促进血管扩张与抗氧化应激损伤,以提高组织血氧供给^[22]。三磷酸是磷酸的缩合形式,含有3个磷酸基团,其会影响三磷酸腺苷的表达。上述物质低水平表达提示模型的能量生成与利用效率降低,经丹红注射液干预后均呈现不同程度上调,进一步佐证丹红注射液调控能量代谢的多效应性。

综上所述,基于“方证对应”逻辑理论,以方药疗效为主要依据,证实活血化痰法对TAC模型疗效明显且优于益气养阴法与益气温阳法,推测模型与心血瘀阻证密切相关。进一步运用生物学技术检测发现,脂代谢紊乱是TAC模型心肌组织的主要代谢表征,其次还涉及糖、氨基酸、丁酸代谢紊乱等多个层面。此外,动脉缩窄与心排血量减少将导致肝脏血液回流障碍,肝脏瘀血而损伤肝功能,扰动血脂的生成与代谢。HDL-C和LDL-C代谢异常是HF发生发展的危险因素,将进一步促进血管损伤与恶化心功能,形成反复的恶性循环^[23]。促使上述代谢产物正常化是丹红注射液的有效治疗靶标,本研究再次验证了中药方剂干预HF模型的多效应性,丰富方证的生物学内涵^[24-26]。本研究为前瞻性研究,仍有可探索之处,如廉洪建等^[27-28]基于宏观表征、行为学表现、病理解剖等角度,发现TAC模型持续存在气虚证候要素,TAC术后8~12周可能为气虚血瘀证,与本研究的心血瘀阻证结论存在一定共性,实现正向评价与逆向反证的相互印证。而对TAC模型联用活血化痰法与益气法,是否较单纯活血化痰法更具疗效,尚有待更深层次的研究与探讨。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

[1] 李欣春,梁昊,胡志希,等. 高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制[J]. 湖南中医药大学学报,2017,37(3):

245-248.

- [2] 李欣春,梁昊,胡志希,等. 高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究[J]. 湖南中医药大学学报,2018,38(8):853-857.
- [3] ZHOU Y, ZHONG S J, HU S Y, et al. Comparison of the effects of Shenfu injection and Shenmai injection on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2018, 11(12): 13169-13179.
- [4] 吴涛. 基于中药制剂干预心肌梗死心衰大鼠的中医证型研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2016.
- [5] 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.
- [6] LU H I, CHUNG S Y, CHEN Y L, et al. Exendin-4 therapy still offered an additional benefit on reducing transverse aortic constriction-induced cardiac hypertrophy-caused myocardial damage in DPP-4 deficient rats [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 778-798.
- [7] 钟森杰,熊霞军,张倩,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(9):117-124.
- [8] 钟森杰,李静,李琳,等. 病证结合动物模型研究思路述评[J]. 中国中医药信息杂志,2021,28(8): 141-144.
- [9] 钟森杰,李静,李琳,等. “以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评[J]. 中华中医药学刊,2021,39(2): 48-50.
- [10] 杨梦,李琳,梁昊,等. 基于阴阳学说探讨巨噬细胞极化在心力衰竭炎症中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):219-226.
- [11] 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.
- [12] RØRTH R, JHUND P S, YILMAZ M B, et al. Comparison of BNP and NT-proBNP in patients with heart failure and reduced ejection fraction [J]. *Circ Heart Fail*, 2020, 13(2): e006541.
- [13] KIRILLOVA V V, SOKOLOVA L A, MESHCHANINOV V N, et al. The level of NT-proBNP in ambulatory patients with chronic heart failure with preserved ejection fraction of the left ventricle [J]. *Ter Arkh*, 2018, 90(9): 68-72.
- [14] CHEN L, SONG J P, HU S S. Metabolic remodeling of substrate utilization during heart failure progression [J]. *Heart Fail Rev*, 2019, 24(1): 143-154.

- [15] BERTERO E, MAACK C. Metabolic remodelling in heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15 (8) : 457-470.
- [16] HEGGERMONT W A, PAPAGEORGIOU A P, HEYMANS S, et al. Metabolic support for the heart: Complementary therapy for heart failure? [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18(12):1420-1429.
- [17] 钟森杰,李欣春,李杰,等. 心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018,38(9):981-985.
- [18] BOOIJ H G, KONING A M, VAN GOOR H, et al. Selecting heart failure patients for metabolic interventions [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17 (2):141-152.
- [19] 成文堃,赵明镜,王蕾,等. 心力衰竭底物代谢重构模式及其机制的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020,26(5):210-219.
- [20] JATAIN S, KAPOOR A, SINHA A, et al. Metabolic manipulation in dilated cardiomyopathy: Assessing the role of trimetazidine [J]. *Indian Heart J*, 2016, 68(6) : 803-808.
- [21] 张莹,史大卓. 曲美他嗪优化心肌代谢的研究进展 [J]. *医学综述*, 2015,21(13):2313-2316.
- [22] NGO D H, VO T S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid [J]. *Molecules*, 2019,24(15):2678.
- [23] MARTINELLI A E M, MARANHÃO R C, CARVALHO P O, et al. Cholesteryl ester transfer protein (CETP), HDL capacity of receiving cholesterol and status of inflammatory cytokines in patients with severe heart failure [J]. *Lipids Health Dis*, 2018,17(1):242.
- [24] 钟森杰,李静,邱宏,等. 参麦注射液对高血压心衰大鼠粪便代谢组学的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021,27(3):418-422.
- [25] 杨梦,胡志希,李琳,等. 参麦注射液对高血压心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学的影响[J]. *中医杂志*, 2020,61(4):334-339.
- [26] 钟森杰,李欣春,李琳,等. 参麦注射液对高血压心衰大鼠血浆代谢组学的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019,39(9):1068-1072.
- [27] 廉洪建. 主动脉弓缩窄术制备小鼠心力衰竭模型的中医证候评价研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [28] 廉洪建,于雪,郑磊,等. 后负荷增加所致心力衰竭模型小鼠气虚证评价[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(5):594-597.

[责任编辑 刘德文]