

# 正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型的建立及代谢组学分析

贾蔷<sup>1</sup>, 阴启明<sup>1</sup>, 李运伦<sup>1,2</sup>, 齐冬梅<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的:通过构建正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型,分析该模型大鼠的血清代谢物,阐释正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型的代谢特征。方法:采用纯化高脂饲料喂养及腹腔注射 *N* $\omega$ -硝基-*L*-精氨酸(*L*-NNA, 剂量 7.625 mg·kg<sup>-1</sup>)的方式构建模型,正常组大鼠喂养普通生长繁殖饲料并腹腔注射等量生理盐水,通过观察两组大鼠一般情况,测量大鼠体质量和尾动脉血压,检测血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量对模型进行评价;运用液相色谱-质谱联用技术分析大鼠血清代谢物变化,采用流动相 0.05% 甲酸水溶液(A)-0.05% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 2%B; 3~9 min, 2%~40%B; 9~18 min, 40%~98%B),电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,采集范围 *m/z* 80~1 000;结合单变量和多变量统计分析筛选组间差异代谢物并进行代谢通路富集分析。结果:与正常组比较,模型组大鼠毛色较暗、懒动、便溏,血压稳定保持在 160/88 mmHg 左右(1 mmHg $\approx$  0.133 kPa),体质量、血糖、TG、TC、LDL-C、MDA 含量明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),GSH-Px 含量显著降低( $P<0.01$ );正、负离子模式下共筛选出差异代谢物 115 个,其中 45 个上调,70 个下调[变量投影重要性(VIP)值 $>1$ ,  $P<0.05$  且差异倍数(FC) $\geq 2$ ],包括吡啶乙醛、5-羟色胺、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、黄嘌呤等,主要通过甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢等途径调控血压。结论:采用纯化高脂饲料喂养结合腹腔注射 *L*-NNA 的方式可以成功构建正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型,吡啶乙醛、5-羟色胺、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、黄嘌呤可作为该模型大鼠特征性血清差异代谢物。

**[关键词]** 正常高值血压; 痰湿壅盛证; 动物模型; 代谢组学; 液质联用技术; 差异代谢物; 代谢通路

**[中图分类号]** R969.1; R28; R544.1; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0171-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220460 **[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.20220429.1409.009.html>

**[网络出版日期]** 2022-04-29 16:56

## Establishment and Metabolomics Analysis of Rat Model of High-normal Blood Pressure with Excessive Phlegm-dampness Syndrome

JIA Qiang<sup>1</sup>, YIN Qiming<sup>1</sup>, LI Yunlun<sup>1,2</sup>, QI Dongmei<sup>1\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct the rat model of high-normal blood pressure with excessive phlegm-dampness syndrome and analyze the serum metabolites and explain the metabolic characteristics of the model rats. **Method:** The model rats of high-normal blood pressure with excessive phlegm-dampness syndrome were fed with high-fat diet and intraperitoneal injected with 7.625 mg·kg<sup>-1</sup> of *N* $\omega$ -nitro-*L*-arginine (*L*-NNA), while rats in the normal group were fed chow diet and injected with the same amount of normal saline. The model was evaluated from the aspects of the general state, body weight, blood pressure and serum biochemical indexes, such as triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), blood glucose, malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

**[收稿日期]** 2022-03-14

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81974555)

**[第一作者]** 贾蔷,在读博士,从事中药分子药理学研究, E-mail:jqsdzmed@163.com

**[通信作者]** \* 齐冬梅,博士,教授,从事方剂组分配伍及作用机制的研究, Tel:0531-89628567, E-mail:qidm119@163.com

Liquid chromatography-mass spectrometry was used to analyze the changes of metabolites in rats serum. The conditions were as follows: mobile phase of 0.05% formic acid aqueous solution (A)-0.05% formic acid acetonitrile solution (B) for gradient elution (0-3 min, 2%B; 3-9 min, 2%-40%B; 9-18 min, 40%-98%B), electrospray ionization (ESI), positive and negative ion detection modes, acquisition range of  $m/z$  80-1 000. Univariate and multivariate statistical analysis were used to screen the differential metabolites between groups which were used to metabolic pathways enrichment analysis. **Result:** Compared with the normal group, the rats in the model group had the characteristics of darker fur, lazy movement and loose stools, the body weight, blood glucose and contents of TG, TC, LDL-C, MDA increased significantly ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and GSH-Px level decreased significantly ( $P<0.01$ ), the blood pressure remained stable at about 160/88 mmHg (1 mmHg $\approx$  0.133 kPa). A total of 115 differential metabolites were screened in the positive and negative ion modes, of which 45 were up-regulated and 70 were down-regulated [variable importance in the projection (VIP) value $>1$ ,  $P<0.05$  and fold change (FC) $\geq 2$ ], including indoleacetaldehyde, 5-hydroxytryptamine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, xanthine and so on, which regulated blood pressure mainly through glycerophospholipid metabolism, linoleic acid metabolism, tryptophan metabolism and arachidonic acid metabolic pathways. **Conclusion:** Feeding with high-fat diet and intraperitoneal injection of *L*-NNA can successfully construct the rat model of high-normal blood pressure with excessive phlegm-dampness syndrome, and indoleacetaldehyde, 5-hydroxytryptamine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine and xanthine can be used as characteristic serum differential metabolites of the rat model.

**[Keywords]** high-normal blood pressure; excessive phlegm-dampness syndrome; animal model; metabolomics; liquid chromatography-mass spectrometry technology; differential metabolites; metabolic pathways

正常高值血压也称高血压前期(收缩压 130~139 mmHg 和(或)舒张压 85~89 mmHg, 1 mmHg $\approx$  0.133 kPa)<sup>[1]</sup>, 是介于正常血压与高血压之间的中间阶段, 常合并多种心血管疾病危险因素, 使得此类人群更容易发展为临床高血压, 增加心肌梗死、卒中等心脑血管疾病的发生率<sup>[2-3]</sup>; 该疾病通常无症状, 其患病率可能被低估, 更容易被忽视, 因此, 仅对高血压患者进行干预难以降低心脑血管事件的发生率。近年来随着“疾病防治重心前移”理念的提出, 对正常高值血压的研究逐渐成为热点。

“痰”在血压进展中发挥着重要作用, 脾气不足, 脾虚无力运化水液, 则生湿生痰, 痰与湿互结, 脾运化失司, 痰湿之浊阻滞气机, 阻碍气血运行, 则气血不畅, 脉道壅滞, 可引起眩晕、头痛。目前临床上对正常高值血压的中医分型尚无明确标准, 有学者通过总结近年来正常高值血压中医证候特点, 提出肝火亢盛、痰湿壅盛、阴虚阳亢、阴阳两虚 4 种常见证型<sup>[4]</sup>; 亦有研究采用流行病学统计分析, 将正常高值血压分为无症状组和有症状组, 有症状组分为肝火炽盛证、痰湿壅盛证、肾阳虚证和阴虚阳亢证<sup>[5]</sup>; 另有学者通过探讨中医体质类型与高血压前期的相关性, 认为痰湿质、阴虚质、血瘀质为正常高

值血压的危险因素<sup>[6]</sup>。上述分析表明痰湿壅盛证是正常高值血压的主要证型之一。中医证候可看作是蛋白质网络和基因调节网络被疾病扰动后所发生的一种特异性偏离状态, 最终集成代谢谱。据报道, 痰湿体质的人群更容易患有代谢紊乱相关疾病且与血压升高密切相关<sup>[7]</sup>, 同时, 正常高值血压患者已经发生了脂质等代谢紊乱<sup>[8-9]</sup>。

目前, 正常高值血压模型大鼠多采用 4~6 周龄的自发性高血压大鼠<sup>[10-11]</sup>, 其血压随周龄增加而升高, 但本课题组前期研究发现, 即使在幼龄期开始采用高脂饲料干预该品系大鼠, 也不能成功诱导痰湿壅盛证, 且目前尚无正常高值血压痰湿壅盛证动物模型构建的报道。因此, 综合文献分析及本课题组前期研究结果<sup>[12-14]</sup>, 本研究拟采用纯化高脂饲料喂养及腹腔注射一氧化氮合酶竞争性抑制剂 *N* $\omega$ -硝基-*L*-精氨酸(*L*-NNA)诱发大鼠血压轻度升高的方式来构建正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型, 通过观察大鼠的一般情况, 动态监测血压, 检测血糖、血脂及氧化应激等指标, 以评估模型的稳定性, 并分析该模型代谢特征, 以期用数据表征该中医证候模型的本质, 为该模型的构建及分子机制研究提供生物学依据。

## 1 材料

BP-2000型动物无创血压分析系统(美国Visitech公司), URIT-8026型全自动生化分析仪(桂林优利特医疗电子有限公司), 5424R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf), AR224CN型电子天平(美国OHAUS), UltiMate 3000型超高液相色谱系统-Q-Exactive型质谱联用仪(美国Thermo Fisher公司)。

L-NNA(美国Sigma-Aldrich公司,批号BCCD9665),甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、葡萄糖(GLU)检测试剂盒(重庆中元生物技术有限公司,批号分别为200802、200901、200901、201001、200901),丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20210511、20210524),水为蒸馏水,甲醇、乙腈、甲酸为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性Wistar大鼠25只,体质量150~180 g, SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。动物适应1周后饲养在12 h/12 h的昼夜循环屏障中,温度(22±2) °C,相对湿度50%~60%,自由饮水和摄食。正常组饲料为总能3.44 kcal·g<sup>-1</sup>(1 cal≈4.18 J)的普通大鼠生长繁殖饲料,模型组饲料为总能4.73 kcal·g<sup>-1</sup>的标准纯化高脂饲料,均由北京科澳协力饲料有限公司加工制作。所有动物实验严格按照山东中医药大学关于实验动物护理和使用的指导原则进行,并经山东中医药大学动物伦理审查委员会批准,批准编号YYLW2021000015。

## 2 方法

**2.1 模型的构建** 动物适应1周后称体质量,随机分组,模型组开始高脂饲料过渡喂养,在第1、3、5、7天逐步递增高脂饲料在日常饲喂中的占比,占比分别为10%、30%、60%、100%,直至过渡到全部高脂饲料喂养,之后自由进食,不限制进食量。正常组大鼠普通饲料进食量与模型组大鼠高脂饲料进食量一致。每周称量大鼠体质量,高脂饲料喂养4周后,统计体质量,剔除体质量低于正常组大鼠体质量均值10%的肥胖抵抗大鼠<sup>[15]</sup>。喂养8周后模型组大鼠按7.625 mg·kg<sup>-1</sup>腹腔注射L-NNA溶液(用0.9%生理盐水配制,现用现配),正常组大鼠腹腔注射等量生理盐水,连续干预3周,每周2次。

**2.2 模型评价指标** 观察大鼠的精神状态、皮毛、食欲、大小便等情况。每周同一时间称量大鼠体质量,

监测血压,每次连续测量6次,取平均值。造模结束后断尾取血,全血置于采血管中,静置30 min后于3 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C离心15 min(离心半径8 cm,下同),分离血清,按试剂盒说明书操作,测定GLU、TG、TC、LDL-C、HDL-C、MDA、GSH-Px水平。

**2.3 代谢组学样品前处理** 精密吸取血清100 μL于1.5 mL离心管中,加入预冷乙腈400 μL沉淀蛋白,涡旋混匀,4 °C静置15 min,于12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清400 μL于2 mL离心管中,用氮吹仪吹干,加入50%乙腈100 μL复溶,涡旋1 min,于12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,用0.22 μm微孔滤膜过滤,待测。精密吸取所有血清样本各10 μL等量混匀,按上述处理方法制备质量控制(QC)样本(预冷乙腈用量为血清的4倍)。

**2.4 检测条件** 色谱条件设定为HALO C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.7 μm),流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温45 °C,进样器温度15 °C,进样量2 μL,流动相选择0.05%甲酸水溶液(A)-0.05%甲酸乙腈溶液(B)进行梯度洗脱(0~3 min,2%B;3~9 min,2%~40%B;9~18 min,40%~98%B)。每次进样前以初始流动相平衡3 min。质谱条件为在正、负离子模式下分别进行采集,电喷雾离子源(ESI),离子源温度350 °C,喷雾电压3.5 kV(ESI<sup>+</sup>)或3 kV(ESI<sup>-</sup>),毛细管温度300 °C,鞘气流速45 arb,辅助气流速10 arb,全扫描一级分辨率7万,MS/MS二级分辨率17 500,S-lens电压50 V,采集范围m/z 80~1 000。

**2.5 代谢组学数据处理** 下机后的原始代谢谱图数据采用R 3.5.1语言数据包XCMS进行数据校正,获得包括m/z、保留时间(t<sub>R</sub>)及峰面积在内的二维数据矩阵。采用支持向量回归(SVR)方法对峰面积进行校正并对各组样本中缺失率>50%的峰进行过滤,进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),分析样本的分类、差异情况及模型是否发生过拟合。应用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)计算变量投影重要性(VIP)值,以VIP值>1,结合单变量分析P<0.05和差异倍数(FC)≥2,最终确定差异代谢物(Mets)。通过检索人类代谢组数据库(HMDB)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、MetDNA2数据库进行比对,将准确度误差阈值固定在10 ppm(1 ppm=1×10<sup>-6</sup>,下同),确认Mets并将其导入MetaboAnalyst 5.0进行通路分析。

**2.6 数据分析** 统计分析采用SPSS 21.0,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用独立样本t检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 模型复制情况** 与正常组比较,模型组大鼠毛色较暗、懒动、纳呆、便溏、肛周不洁,体质量增加明显,见表1。结果发现高脂饲料喂养4周,模型组大鼠体质量显著增加( $P<0.01$ ),继续高脂饲料喂养至8周后,模型组大鼠体质量均大于正常组大鼠体质量平均值的20%。经L-NNA干预后,模型组大鼠次日便出现狂躁现象,血压较正常组呈上升趋势,见图1,正常组大鼠血压维持在135/70 mmHg左右,干预3周后模型组大鼠血压在160/88 mmHg左右,与正常组比较差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),之后再连续监测7周血压,血压保持稳定。造模后,与正常组比较,模型组TG、TC、LDL-C、GLU、MDA水平均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),GSH-Px水平显著降低( $P<0.01$ ),HDL-C则无明显变化,具体实验数据见表2。

表1 两组大鼠经高脂诱导后不同时间点的体质量( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Body weight changes of rats in different groups at different time of high-fat induction ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	体质量/g								
	干预前	高脂1周	高脂2周	高脂3周	高脂4周	高脂5周	高脂6周	高脂7周	高脂8周
正常组	212.40±6.88	267.20±15.47	290.20±18.45	322.50±28.40	334.00±27.16	362.10±32.24	363.50±34.96	379.40±37.91	385.50±36.32
模型组	207.30±13.02	265.60±15.71	304.50±23.03	337.00±26.69	384.50±33.37 <sup>1)</sup>	425.30±25.63 <sup>1)</sup>	434.00±37.18 <sup>1)</sup>	473.50±8.18 <sup>1)</sup>	501.50±8.52 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ (图1、表2和表3同)

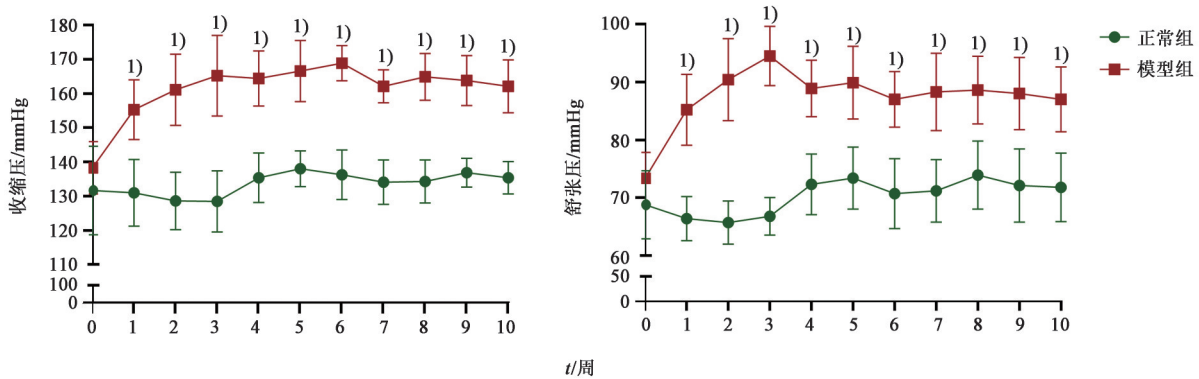


图1 两组大鼠造模前后的收缩压和舒张压变化( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Fig. 1 Changes of systolic and diastolic blood pressure of rats in different groups ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

表2 两组大鼠血清生化指标的表达式水平( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Expression levels of biochemical indexes of rat serum in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

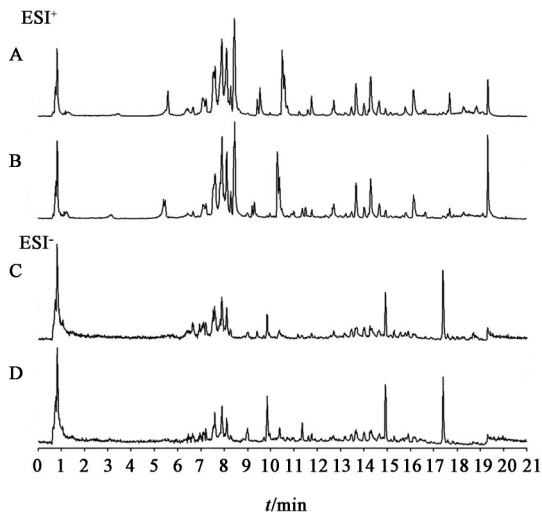
组别	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	HDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	LDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	GLU/mmol·L <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	GSH-Px/μmol·L <sup>-1</sup>
正常组	0.96±0.21	1.74±0.17	1.10±0.17	0.54±0.11	6.49±0.75	4.51±0.68	1 026.37±134.30
模型组	1.33±0.25 <sup>1)</sup>	2.47±0.33 <sup>1)</sup>	1.21±0.27	0.68±0.12 <sup>2)</sup>	8.44±1.36 <sup>1)</sup>	5.63±0.98 <sup>1)</sup>	808.98±51.14 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$

**3.2 大鼠血清代谢物多元数据分析** 在正、负离子模式下,正常组、模型组血清样品中的代谢物得到了较好分离,总离子流色谱图(TIC)见图2。PCA结果表明组内样本聚集在一起,差异较小,可见组内样本重复较好,说明检测过程具有良好稳定性,数据质量较高;正常组和模型组的内源性代谢物差异明显,说明模型组的代谢模式发生明显改变,PCA二维得分图见增强出版附加材料。建立了PLS-DA模型并进行了200次置换检验,正、负离子模式的PLS-DA模型置换检验结果均为 $P<0.01$ ,正离子模式下 $R^2Y$ (表示模型的解释能力值)=0.997, $Q^2$ (表示

模型的预测能力值)=0.971,负离子模式下 $R^2Y=0.993, Q^2=0.912$ ,说明模型不存在过拟合现象,具有良好的解释能力和预测能力,置换检验图见增强出版附加材料。

**3.3 Mets的鉴定** 在不降低模型预测能力的前提下进行OPLS-DA处理,得到VIP值>1的变量,将VIP值>1、FC≥2且 $P<0.05$ 的变量判定为包含潜在生物标志物信息的有效数据,筛选得出符合条件差异变量;结果在正、负离子模式下筛选得到的Mets共115个,其中45个上调、70个下调,将Mets进行聚类分析,见图3,进一步证明了模型组大鼠的代谢模式

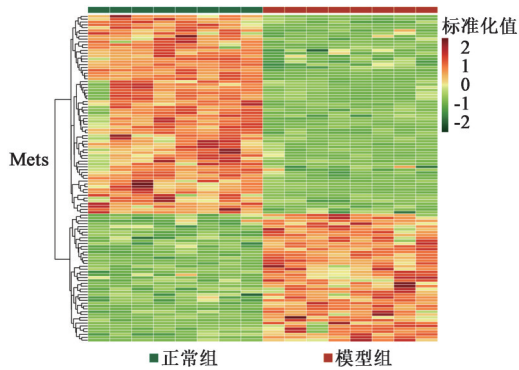


注:A、C.正常组;B、D.模型组

图2 不同离子模式下两组大鼠血清样品的TIC

Fig. 2 TIC of rat serum samples from two groups under different ion modes

发生明显变化。以VIP值从大到小排序,其中排序前30个Mets见表3,包括吡啶乙醛、7 $\alpha$ -羟基-4-胆甾烯-3-酮、5-羟色胺等。



注:红色代表高表达,绿色代表低表达

图3 模型组和正常组Mets的热分析

Fig. 3 Heat map of Mets between model and normal groups

**3.4 代谢通路分析** 将从两组筛选出的Mets进行KEGG通路拓扑分析及超几何检验分析,见图4,结果发现特征性Mets汇集到18条通路影响值 $>0.01$ 的代谢通路,分别为亚油酸代谢、D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢、组氨酸代谢、色氨酸代谢、甘油磷脂代谢、烟酸和烟酰胺代谢、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、嘌呤代谢等;其中 $P<0.05$ 的代谢通路有亚油酸代谢、组氨酸代谢、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、色氨酸代谢。

#### 4 讨论

体质量、血压、TC、TG、GLU较高时,正常高值血压发病率也较高<sup>[16]</sup>,其是正常高值血压的常见危

险因素和异常表现<sup>[17-18]</sup>。采用纯化高脂饲料喂养及L-NNA诱导方式构建的模型大鼠毛色较暗、懒动、便溏,体质量显著升高,大鼠血清GLU、TG、TC、LDL-C水平均明显升高,符合“痰浊”特有的重要生化指标和物质基础<sup>[19-21]</sup>;模型大鼠血压平均值在160/88 mmHg左右,且血压长时间稳定在正常高值血压阶段<sup>[10,22-23]</sup>。当自由基清除剂GSH-Px不足,过多的活性氧无法及时清除,会导致MDA的过度产生,损伤血管内膜,血压升高<sup>[24]</sup>,1项横断面研究显示,高血压前期受试者的氧化应激显著增加<sup>[25]</sup>。本研究中模型大鼠MDA升高、GSH-Px降低,说明模型大鼠已经出现了氧化应激损伤。综上所述,该方法用于构建正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型是可行的。

据报道,我国2.45亿成人高血压患者中超过一半患者合并血脂异常,二者并存可加速动脉粥样硬化进程,增加心血管事件,降低血脂的变异性有利于高血压的管理<sup>[26]</sup>。痰湿壅盛证高血压患者最易合并脂质代谢紊乱<sup>[27]</sup>,超重合并腹型肥胖的正常高值血压人群比正常人存在更多的糖脂代谢异常<sup>[28]</sup>。本研究发现模型大鼠已经发生糖脂代谢紊乱,Mets主要富集到了戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢途径,其中溶血磷脂酰胆碱显著降低,而溶血磷脂酰胆碱与收缩压降低独立相关<sup>[29-31]</sup>;磷脂酰胆碱显著升高,这与高血压大鼠血清代谢物中该物质表达水平一致<sup>[30]</sup>。亚油酸是花生四烯酸生物合成的前体,有助于维持前列腺素和血栓素的生理水平,调节血管张力<sup>[32]</sup>,血浆中亚油酸水平升高及花生四烯酸水平降低可预防高血压<sup>[33]</sup>,这可能与提高一氧化氮生物利用度和改善内皮功能障碍有关<sup>[34]</sup>。本文研究发现模型大鼠亚油酸水平显著降低,与文献报道一致,且花生四烯酸的代谢物前列腺素显著降低,恰也说明血压早期干预的重要性。

色氨酸是吡啶乙醛、烟酰胺、5-羟色胺等物质合成的前体物质。色氨酸治疗已被证明可降低轻、中度原发性高血压患者血压,其代谢产物5-羟色胺等神经递质具有强大的血压调节功能<sup>[35]</sup>,5-羟色胺系统的失调与各种血管收缩剂的作用有关<sup>[36]</sup>,且5-羟色胺的浓度与肥胖呈负相关<sup>[37]</sup>。本研究发现模型大鼠Mets中吡啶乙醛、5-羟色胺显著下降,色氨酸中间产物甲氧基吡啶乙酸显著升高,说明模型大鼠通过影响色氨酸代谢调控血压。此外,Mets中烟酰胺发生显著变化,而烟酰胺的前体物质烟酰胺核糖

表3 模型组和正常组的前30个Mets信息

Table 3 Information of the first 30 Mets between model and normal groups

离子模式	$t_R$ /min	母离子 $m/z$	相对分子质量	化合物	分子式	VIP值	$\log_2FC$	$\delta/ppm$	趋势
ESI <sup>+</sup>	2.670 6	177.102 2	159.068 4	吡啶乙醛	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO	1.789	-5.811	0.544	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	11.864 8	515.207 8	400.334 1	7 $\alpha$ -羟基-4-胆甾烯-3-酮	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	1.741	1.144	2.582	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	2.671 9	199.084 1	176.095 0	5-羟色胺	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	1.734	-1.604	0.400	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	19.413 4	241.030 9	240.023 8	L-胱氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	1.703	-3.723	0.662	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	11.268 5	553.329 4	552.329 8	lithocholate 3-O-glucuronide	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	1.664	-3.651	2.165	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	12.783 5	468.308 2	467.301 2	溶血磷脂酰胆碱(14:0/0:0)	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	1.653	-1.953	0.713	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	5.082 8	236.009 3	215.034 9	3-氯酪氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClNO <sub>3</sub>	1.636	-3.374	0.824	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	17.339 0	329.247 0	328.240 2	二十二碳六烯酸	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1.634	-1.245	0.901	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	18.607 2	792.532 4	757.562 2	磷脂酰胆碱(18:2/16:0)	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	1.629	1.618	0.622	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	1.120 8	236.998 1	192.027 0	异柠檬酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	1.615	-2.271	0.486	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	14.784 5	824.581 2	805.583 3	磷脂酰丝氨酸(15:0/22:0)	C <sub>43</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>10</sub> P	1.612	-3.504	0.365	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	16.929 5	411.267 5	376.297 7	石胆酸	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	1.593	-2.583	0.385	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	11.751 9	389.210 3	354.240 6	前列腺素F <sub>2<math>\alpha</math></sub>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	1.588	-2.987	0.765	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	8.039 2	876.546 5	831.577 8	磷脂酰胆碱(20:2/20:5)	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	1.582	3.468	2.978	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	16.270 2	433.236 0	434.243 3	溶血磷脂酸(18:2/0:0)	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	1.571	7.658	0.320	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	15.424 7	457.236 4	458.243 3	溶血磷脂酸(20:4/0:0)	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	1.564	4.652	0.704	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	10.831 7	313.237 0	312.230 1	13-L-氢过氧基亚油酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	1.560	-2.279	0.900	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	6.394 9	178.049 9	179.058 2	马尿酸	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	1.559	-2.529	2.407	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	1.207 4	123.055 5	122.048 0	烟酰胺	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	1.551	1.122	0.488	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	3.119 9	147.043 9	148.052 4	肉桂酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1.542	1.769	3.075	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	9.739 7	367.212 6	368.219 9	20-羟基前列腺素E <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	1.534	-3.241	0.891	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	4.359 8	188.070 5	205.073 9	甲氧基吡啶乙醛	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	1.525	1.259	0.287	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	5.925 2	292.096 5	309.106 0	N-乙酰神经氨酸	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub>	1.524	3.138	1.335	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	13.224 0	760.513 7	761.520 7	磷脂酰丝氨酸[14:0/20:1(11Z)]	C <sub>40</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>10</sub> P	1.522	-2.836	0.187	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	13.517 0	758.498 4	759.505 0	磷脂酰丝氨酸[14:1(9Z)/20:1(11Z)]	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>10</sub> P	1.485	-2.328	0.410	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	1.618 8	156.067 7	155.069 5	组氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1.469	1.044	3.107	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	0.949 8	121.039 9	138.042 9	尿刊酸	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.467	1.935	0.675	↑ <sup>1)</sup>
ESI <sup>-</sup>	6.774 2	421.136 7	440.155 7	氨基蝶呤	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	1.448	-1.948	1.544	↓ <sup>1)</sup>
ESI <sup>+</sup>	9.938 7	237.119 5	190.106 6	N $\omega$ -羟基-L-精氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.430	1.954	0.400	↑ <sup>1)</sup>

注: ↑.表达水平上调; ↓.表达水平下调

是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的重要组成部分,在机体内通过烟酸和烟酰胺代谢发挥抗氧化活性。黄嘌呤氧化酶直接催化黄嘌呤产生超氧阴离子和尿酸,超氧阴离子增强导致一氧化氮的生物利用度降低,引起血管内皮功能障碍,血压升高;尿酸水平升高可能与高血压前期风险增加有关<sup>[38]</sup>,增加盐敏感性<sup>[39]</sup>,促进脂肪储存和脂肪生成。黄嘌呤氧化酶相关的氧化应激也可能诱发内皮功能障碍和肾血管收缩,肾结构异常进一步导致盐敏感性和尿酸依赖性高血压<sup>[40]</sup>。本研究中模型大鼠代谢物黄嘌呤显著下降,提示模型大鼠血压升高很有可能是由于血

管内皮功能障碍、血管收缩导致的。

综上所述,采用标准纯化高脂饲料喂养及腹腔注射L-NNA诱导方法可以成功制备正常高值血压痰湿壅盛证大鼠模型,模型大鼠痰湿证候显著且血压可长期保持在正常高值血压阶段,高脂饲料配比清晰,成模率高,具有较高的一致性和稳定性。进一步运用液质联用技术分析大鼠血清代谢物,通过对模型组大鼠与正常组大鼠的血清代谢物比较,发现模型大鼠发生明显的糖脂代谢紊乱,血清代谢物中溶血磷脂酰胆碱、吡啶乙醛、5-羟色胺、黄嘌呤显著下降,磷脂酰胆碱显著升高,主要通过甘油磷

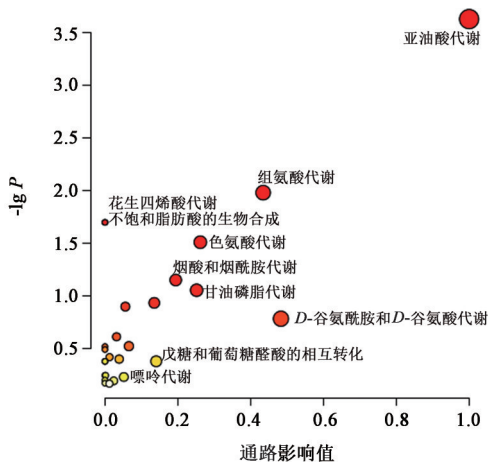


图4 正常高值血压痰湿壅盛证模型大鼠特征血清代谢物的通路分析

Fig. 4 Pathway analysis of characteristic serum metabolites in rat model of high-normal blood pressure with excessive phlegm-dampness syndrome

脂代谢、亚油酸代谢、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢途径影响血管舒缩功能、炎症反应及氧化应激发挥调控血压作用;根据已知分子功能,笔者认为该模型特征性Mets为吡啶乙醛、5-羟色胺、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、黄嘌呤等。本研究可为正常高值血压证候模型研究和客观认识正常高值血压痰湿壅盛证提供依据。但在模型制备过程中,仍有部分大鼠未能诱导成功,可能是肥胖抵抗导致,且本文仅选用了1种品系大鼠进行诱导,其他品系大鼠是否也可以成功复制该模型仍需进一步验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] UNGER T, BORGHI C, CHARCHAR F, et al. 2020 International society of hypertension global hypertension practice guidelines [J]. Hypertension, 2020, 75(6):1334-1357.  
[2] ZHAO L, MENG X, ZHANG Q Y, et al. A narrative review of prehypertension and the cardiovascular system: Effects and potential pathogenic mechanisms [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(2):170.  
[3] KACHUR S, MORERA R, DE SCHUTTER A, et al. Cardiovascular risk in patients with prehypertension and the metabolic syndrome [J]. Curr Hypertens Rep, 2018, 20(2):15.  
[4] 李媛媛,胡亮亮,王忆勤,等. 正常高值血压中医证候特点研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10):4747-4749.  
[5] 张世君,齐冬梅,李运伦,等. 基于因子分析和聚类分析的正常高值血压人群中中医证候研究[J]. 中医杂

志, 2016, 57(20):1759-1763.  
[6] 祖建,陈光辉,钟骏慧,等. 高血压前期中医体质特点初步研究[J]. 中国中医急症, 2013, 22(8):1328-1329,1344.  
[7] LI L R, FENG J, YAO H Q, et al. Gene expression signatures for phlegm-dampness constitution of Chinese medicine [J]. Sci China Life Sci, 2017, 60(1):105-107.  
[8] KIM M, JUNG S, KIM S Y, et al. Prehypertension-associated elevation in circulating lysophosphatidylcholines, Lp-PLA2 activity, and oxidative stress [J]. PLoS One, 2014, 9(5):e96735.  
[9] 王宇. 正常高值血压肝火亢盛证宏观量化诊断标准的建立及代谢机制研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2017.  
[10] HE D H, LIN J X, ZHANG L M, et al. Early treatment with losartan effectively ameliorates hypertension and improves vascular remodeling and function in a prehypertensive rat model [J]. Life Sci, 2017, 173:20-27.  
[11] BURRELL L M, RISVANIS J, DEAN R G, et al. Age-dependent regulation of renal vasopressin V<sub>1A</sub> and V<sub>2</sub> receptors in rats with genetic hypertension: Implications for the treatment of hypertension [J]. J Am Soc Hypertens, 2013, 7(1):3-13.  
[12] 李丽雅,刘玉猛,李惠子,等. AKK菌对高脂饲料诱导的肥胖大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(7):41-45.  
[13] 罗晶晶,姚雪萍,轩然,等. 洋甘菊提取物对左旋硝基精氨酸诱导高血压大鼠血压的影响及机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16):5719-5723.  
[14] LI Y L, YANG W Q, ZHU Q J, et al. Protective effects on vascular endothelial cell in N'-nitro-L-arginine (L-NNA) -induced hypertensive rats from the combination of effective components of *Uncaria rhynchophylla* and Semen Raphani [J]. Biosci Trends, 2015, 9(4):237-244.  
[15] HARIRI N, THIBAUT L. High-fat diet-induced obesity in animal models [J]. Nutr Res Rev, 2010, 23(2):270-299.  
[16] RAMEZANKHANI A, HARATI H, BOZORGMANESH M, et al. Diabetes mellitus: Findings from 20 years of the Tehran lipid and glucose study [J]. Int J Endocrinol Metab, 2018, 16(Suppl 4):e84784.  
[17] KUMAR K V S H, PATNAIK S K. Incidence of essential hypertension in young adult males followed for over two decades [J]. Indian Heart J, 2018, 70

- (Suppl 3):S1-S3.
- [18] 徐嘉欣. 正常高值血压的危险因素、靶器官损害与中医体质相关性研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [19] 吴赛, 姜月华, 杨传华, 等. 痰湿壅盛证高血压大鼠模型的建立与评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 222-228.
- [20] 刘迎辉, 潘博涵. 引血下行化痰逐瘀降压牛膝方对痰湿壅盛高血压大鼠尾动脉血压、血管紧张素Ⅱ影响随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(11): 162-164.
- [21] 李兰心, 陈新宇, 蔡虎志. 温胆汤合血压平方加减治疗中青年高血压痰湿壅盛证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 106-111.
- [22] 吴信华, 李长印, 曹园, 等. 基于LC/Q-TOF-MS整合网络药理学探讨潜阳固阴颗粒防治高血压肾损害的药效物质基础与作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 116-129.
- [23] SIMÕES R P, FARDIN P B A, SIMÕES M R, et al. Long-term mercury exposure accelerates the development of hypertension in prehypertensive spontaneously hypertensive rats inducing endothelial dysfunction: The role of oxidative stress and cyclooxygenase-2[J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 196(2): 565-578.
- [24] TAIN Y L, HSU C N. Oxidative stress-induced hypertension of developmental origins: Preventive aspects of antioxidant therapy[J]. Antioxidants, 2022, 11(3): 551.
- [25] THIYAGARAJAN R, PAL P, PAL G K, et al. Cardiovascular modulation, oxidative stress, and cardiovascular risk factors in prehypertensive subjects: Cross-sectional study[J]. Am J Hypertens, 2013, 26(7): 850-857.
- [26] DONG Y L, LIU X K, ZHAO Y X, et al. Attenuating the variability of lipids is beneficial for the hypertension management to reduce the cardiovascular morbidity and mortality in older adults [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 692773.
- [27] 杨金果, 汤献文, 严权浩. 高血压病患者不同证型与糖脂代谢、颈动脉斑块相关性研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(11): 52-55.
- [28] 王鲁雁, 孙宁玲, 张晓辉, 等. 超重合并腹型肥胖的正常高值血压人群炎症因子变化及相关因素分析[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(3): 246-250.
- [29] YANG J, VILLAR V A M, JOSE P A, et al. Renal dopamine receptors and oxidative stress: Role in hypertension[J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(9): 716-735.
- [30] ZHANG L, YU J, LIU Y Y, et al. Effect of Yishenjiangyafang on plasma metabolomics in senile spontaneously hypertensive rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8868267.
- [31] HUANG C C, HUANG Y L, LIN C H, et al. Plasma metabolomic profiles associated with hypertension and blood pressure in response to thiazide diuretics [J]. Hypertens Res, 2022, 45(3): 464-473.
- [32] FÉLÉTOU M, HUANG Y, VANHOUTTE P M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(3): 894-912.
- [33] TSUKAMOTO I, SUGAWARA S. Low levels of linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid and high levels of arachidonic acid in plasma phospholipids are associated with hypertension [J]. Biomed Rep, 2018, 8(1): 69-76.
- [34] NUNES D O, MARQUES V B, ALMENARA C C P, et al. Linoleic acid reduces vascular reactivity and improves the vascular dysfunction of the small mesentery in hypertension [J]. J Nutr Biochem, 2018, 62: 18-27.
- [35] ZIEGLER M G, MILIC M. Sympathetic nerves and hypertension in stress, sleep apnea, and caregiving [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2017, 26(1): 26-30.
- [36] ZHAO H, LIU Y J, LI Z, et al. Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. Clin Chim Acta, 2018, 486: 192-198.
- [37] LISCHKA J, SCHANZER A, BAUMGARTNER M, et al. Tryptophan metabolism is associated with BMI and adipose tissue mass and linked to metabolic disease in pediatric obesity [J]. Nutrients, 2022, 14(2): 286.
- [38] LIU L L, ZHANG X, LI Q M, et al. Serum uric acid and risk of prehypertension: A dose-response meta-analysis of 17 observational studies of approximately 79 thousand participants [J]. Acta Cardiol, 2022, 77(2): 136-145.
- [39] WANG Y, HU J W, LYU Y B, et al. The role of uric acid in hypertension of adolescents, prehypertension and salt sensitivity of blood pressure [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 790-795.
- [40] DE BECKER B, BORGHI C, BURNIER M, et al. Uric acid and hypertension: A focused review and practical recommendations [J]. J Hypertens, 2019, 37(5): 878-883.

[责任编辑 刘德文]