**分类号：R543.2 学校代码：10392**

**学科专业代码：100201** 学 **号：1101003014**

**福 建 医 科 大 学**

**博 士 研 究 生 毕 业 论 文**

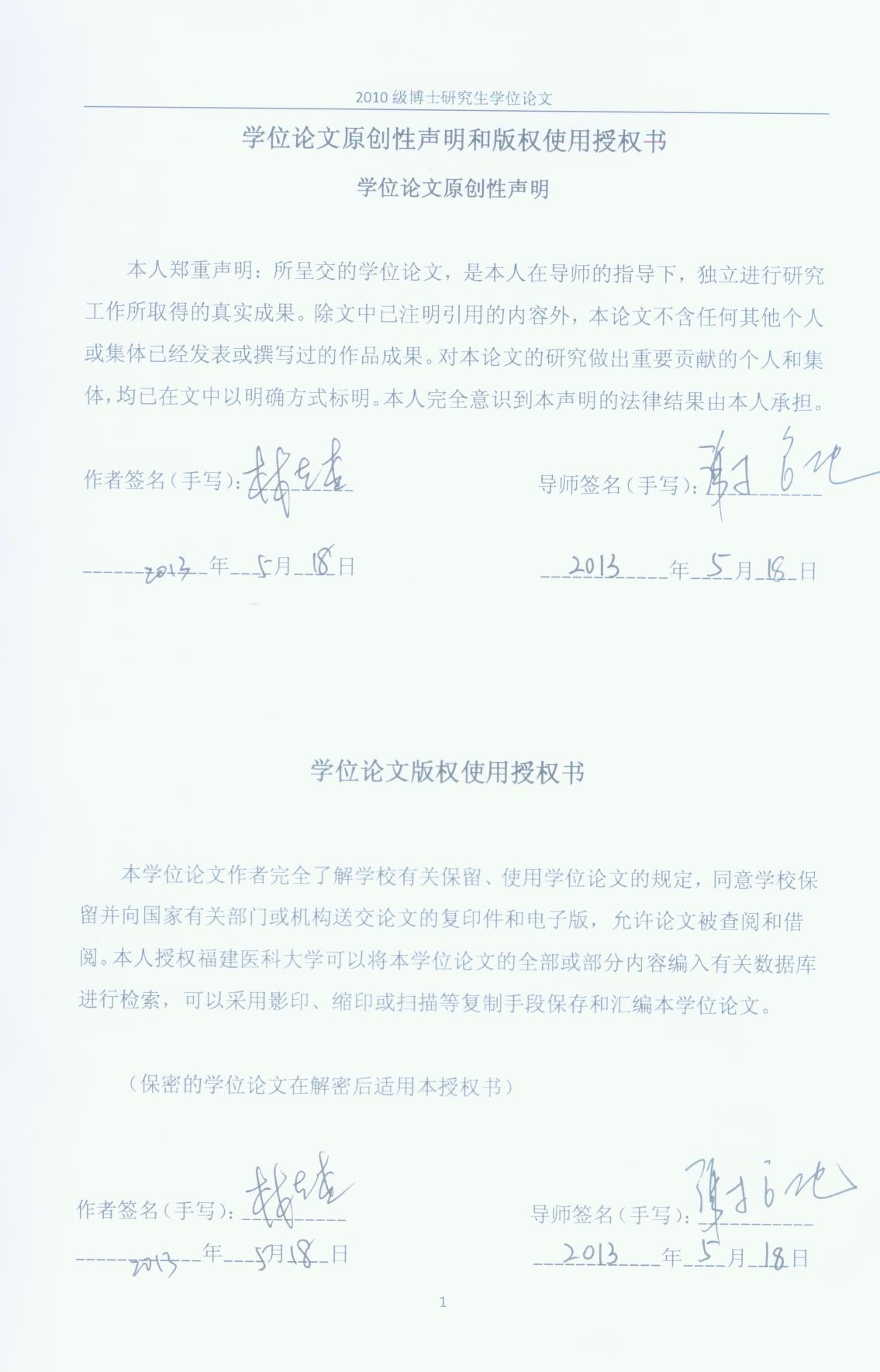
**基于 1NMR 代谢组学方法研究阿托伐他汀对肺动脉高压大鼠的代谢模式影响及分子机制**

**Mechanisms and effects of atorvastatin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by 1NMR-based metabonomic**

**analysis**

|  |  |
| --- | --- |
| **学 位 类 型 ：**  **所 在 院 （ 系 ） ：** | **医学博士**  **第一临床医学院** |
| **研** 究 生 **：** | **林太杰** |
| **学 科 （ 专 业 ） ：** | **内科学（心血管病）** |
| **导** 师 **：** | **谢良地 教授** |
| **研 究 起 止 日 期 ：** | **2010 年 10 月至 2013 年 6 月** |
| **答 辩 日 期 ：** | **2013 年 6 月 4 日** |

**二〇一三年六月**



**目 录**

摘 要

基于核磁共振（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）的代谢组学方法是 H

1

NMR波谱检测技术和模式识别分析技术的结合，不仅可以用于药物药效、毒性的评估以及其作用机制的阐明，也可以用于揭示疾病的发病机制、生物学标志物的筛选和早期诊断。本论文应用基于NMR的代谢组学方法，研究阿托伐他汀对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠代谢的影响及其分子机制。全文共分为三个部分，各部分内容概述如下：

第一部分 研究野百合碱诱发的肺动脉高压大鼠的NMR代谢组学变化。对照组大鼠、应用MCT腹腔注射构建的PAH模型大鼠进行平均肺动脉压(mPAP)的检测、右心室肥厚指数的测定及肺小动脉显微结构的观察，并采用NMR技术，进行血清

NMR氢谱检测及分析。研究发现：野百合碱（Monocrotaline, MCT）可以成功建立肺动脉高压模型，2周就开始出现肺血管重塑，并且肺血管重塑先于压力升高出现。注射野百合碱后大鼠不同时点出现不同的代谢模式，出现应激状态和细胞损伤、针对损伤的代偿修复反应、脂肪酸β氧化和Warburg效应；大鼠肺小动脉的重塑与2、3周出现脂肪酸β氧化和Warburg效应代谢模式改变密切相关；肉碱、β-羟丁酸、柠檬酸升高，乙酸、丙酮下降这些指标变化可以作为病变严重程度的参考指标。

第二部分 研究阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠的NMR代谢组学变化。阿托伐他汀治疗后的PAH大鼠进行平均肺动脉压(mPAP)的检测、右心室肥厚指数的测定及肺小动脉显微结构的观察，并采用NMR技术，进行血清NMR氢谱检测及分析。研究发现：阿托伐他汀可以明显改善肺血管重塑，并且与其抑制脂肪酸β氧化和

Warburg效应相关。

第三部分用Realtime-PCR方法测肺组织GSK-3β和SERBP-1c、己糖激酶、CPT

-1 mRNA水平；用Western-Blotting方法测GSK-3β、P－GSK-3β、SERBP-1c及CPT

-1蛋白表达。研究发现：MCT注射后GSK-3β表达下降，己糖激酶激活；MCT注射后固醇调节元件结合蛋白表达下降，CPT-1激活，脂肪酸氧化增强。阿托伐他汀

可以抑制GSK-3β的表达下降，从而抑制己糖激酶；阿托伐他汀可以激活固醇调节元件结合蛋白，抑制CPT-1，脂肪酸氧化减弱。

关键词：核磁共振；代谢组学；阿托伐他汀；野百合碱；肺动脉高压大鼠；肺血 管重塑； Realtime-PCR；Western-Blotting

**Abstract**

Metabolomics based on nuclear magnetic resonance (NMR) is a combines the 1H NMR spectroscopic detection with pattern recognition technologies. It can be used for explaining the pharmacodynamic action, toxicological assessment and the mechanism. It can also be used for explaining the pathogenesis, screening biomarker and early

diagnosis. In the basicscientific research, the metabolomics based on NMR was used

for exploring the metabolism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats and the underlying molecular mechanisms of atorvastatin. This theme consists of three parts as follows：

**Part I** Study the changes of metabolism based NMR in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. The rats were divided into two groups: control rats (Ctr) and rats of PAH induced by MCT ( PAH ). The mean pulmonary arterial pressure(MPAP), the index of right ventricular hypertrophy and microstructure of pulmonary artery were detected, and the samples of serum were detected by the

hydrogen spectrum of the serum NMR. It was found that PAH was established successfully by MCT. The remodeling of pulmonary vascular appeared in the 2nd week and the pulmonary hypertension developed in the 3rd week. The different metabolic patterns such as stress, cell damage, repairing for damaged tissue, the fatty acidβ-oxidation and the Warburg effect in rats were found at different time points after the injection of monocrotaline. The pulmonary artery reconstruction in rat was closely related with the fatty acidβ-oxidation and the Warburg effect in 2nd week and 3rd week. The increasing of carnitine, β-hydroxybutyric acid, citric acid and the decline of acetic acid, acetone would be as parametesr of deterioration of pathological change in PAH rats.

**Part II** Study on the changes of metabolism based NMR in rats with pulmonary hypertension treated by atorvastatin. PAH rats treated with atorvastatin(Ato). The

Mean pulmonary arterial pressure(MPAP), the index of right ventricular hypertrophy and microstructure of pulmonary artery were detected, and the samples of serum were detected by the hydrogen spectrum of the serum NMR. The pulmonary vascular remodeling was improved significantly by atorvastatin. The inhibition of fatty acidβ-oxidation and and the Warburg effect were closely related with atorvastatin.

**Part Ⅲ**Study on the molecular mechanism of metabolic changes in rats with

Pulmonary hypertension model of atorvastatin on monocrotaline induced. The expression of both mRNA and protein of GSK-3β，SERBP-1c, hexokinase, and the

CPT-1 in the rats were measured by RT-PCR and Western-Blot in all three groups. First, it was found that expression of GSK-3βwas decreased and hexokinase was activatied after the injection of MCT. Second, the expression of sterol regulatory element binding protein was decreased as well as the activation of CPT-1 and the enhancement of fatty acid oxidation. Third, the decreased expression of GSK-3βwould be inhibited by atorvastatin inhibiting hexokinase. Atorvastatin also activated the sterol regulatory element binding protein, then inhibited CPT-1, and then decreased fatty acid oxidation.

**Keywords:** NMR; metabolomics; atorvastatin; monocrotaline; molecular mechanisms; pulmonary hypertension; Realtime-PCR; Western-Blotti

# ng

前 言

近年来，代谢组学在世界范围内得到飞速发展，目前其最新的定义通常是指对分子量小于1000道尔顿的代谢物质进行高通量的定性、定量分析，通过内因和外因变化来分析生物体内代谢的变化规律[1]。Metabonomics的概念是Nicholson等人[2]提出的，他对其定义是生物系统在病理生理刺激后机体内环境或其体内基因改变后导致代谢反应变化的一种定量测定的方法，并不包括所有代谢物的变化。Fiehn等人提出metabolomics概念，与Nicholson等人不同的是将其定义为对机体所有代谢产物的定性定量分析，并将其限制在一定条件下的特定体液标本样品，因此其定义更加广泛，更侧重于对代谢物的轮廓（谱）进行全面的分析，对于机体非病理情况下刺激的反应也归纳到研究的范畴[3]。今天随着系统生物学信息建模技术的发展，代谢组学由于有灵敏度高、标本取材方便、检测快速、结果准确等优势，因此和蛋白质组、基因组学、转录组学等技术一样，已成为系统生物学重要的组成部分，尤其在疾病的发展及信号传导机制的研究中具有重要的作用。代谢组学常用的研究技术包括有：气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)；液质联用(LC-MS)；核磁共振(NMR)。但色谱方法对进样品的预处理过程比较复杂，过程繁琐，因此花费的时间比较长；而且气质联用对标本种类有限制，尤其对于非挥发性代谢物质无法检测；然而NMR技术具有对标本损伤性较小，标本来源容易，可以重复检测、检测所有代谢物无偏向性等优势，因此NMR技术现在已成为最常用的代谢组检测方法。当然NMR技术也有劣势，如存在检测代价比较高等[4]。基于

NMR的代谢组学，对代谢产物的分析实验步骤包括样品的收集；样本NMR谱的采集；对NMR谱进行傅里叶变换（FT）、函数加窗、基线和相位的校正，谱学数据归一化、分段积分和标度化等预处理及聚类分析；识别特征性代谢物，并对可能受干扰的代谢途径进行分析。一维1HNMR谱图通常含有几千甚至上万个数据点，利用模式技术对这种高维的数据集进行数据分析，达到数据降维和对样品分类或判别的目的是代谢组学研究的关键。代谢组学模式识别技术最常用的有无监督的主成分分析方法、有监督的偏最小二乘法-判别式分析（PLS-DA）和正交偏最小二乘法

-判别式分析(OPLS-DA)。近年来代谢组学已经被广泛应用在微生物、植物代谢基础研究、药物的研发方面以及对疾病进行早期诊断、发现特征的生物标志物，对其生化过程、发病机制进行深入研究来探讨人类重大的疾病[5]，并且揭示生物体代谢调控网络之间的相互关系[6]。代谢组学技术由于其灵敏度较高，很多生理或环境因素的微小变化都能被检测出来，对于疾病的早期诊断有非常重要的作用，并在寻找机体生物特征标志物有着临床方面强大的应用能力。近年来代谢组技术在疾病诊断、机制及治疗等方面中的研究越来越受到人们的重视[7]。代谢组学不仅仅用于肿瘤、肝病疾病诊断、机制研究，还用于[8]老年抑郁症、风湿性关节炎

[9]、肾病[10]、高血压[11]、II型糖尿病[12-14]，尤其在心血管病[15-16]、炎症性肠病[17]、

哮喘[18]、脑膜炎[19]以及精神分裂症[20]等多种疾病的研究。

肺动脉高压（Pulmonary Arterial Hypertension, PAH）是以肺小血管痉挛、内膜增生及重塑和微血栓病灶形成为主要特征的一种严重的疾病，最终导致右心室负荷增加，右心功能衰竭。血管重塑是多条维持血管结构和功能完整性的信号通路调节异常的结果。平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞的增殖迁移，导致肺血管重塑，最终导致肺小动脉管腔的阻塞，是肺动脉高压的主要发病机制。影响和促进PAH形成的因素众多、机制复杂。目前认为肺血管重塑是导致肺动脉压力持续增高的主要原因[21]。MCT导致PAH的分子机制已经有很多文献进行了报道，主要集中在转化生长因子[22]、Smurf1表达增加[23]、ROCK途径[24-25]、ET-1 [26-27]、肾上腺髓质素[28]、一氧化氮和热休克蛋白90 [29]、血栓素[30]、PGI2 [31]方面。尽管如此，肺动脉高压机制仍然不明确。

在过去的几十年里，PAH的药物治疗有了很大的进展。羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂（他汀类药物）具有多效性，它可以改善血管内皮功能、抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移、减轻炎性反应、抑制血小板聚集等[32-34]。本研究小组的前期研究表明，氟伐他汀可以抑制心肌纤维化和血管平滑肌细胞增殖

[35-36]；氟伐他汀改善自发性高血压大鼠阻力血管功能及逆转阻力血管结构重塑[37-38]；氟伐他汀改善老年高血压患者内皮依赖性血管舒张功能[39]。Toshihiko等

研究表明辛伐他汀可降低MCT诱导PAH大鼠肺动脉压力，并且改善肺血管重塑[40]。最近，我们小组前期研究发现阿托伐他汀可以明显降低MCT诱导PAH大鼠肺动脉压

力和逆转肺动脉高压时的血管重建[41]，但是关于其机制仍然不明确。虽然近年来有文献报道在体外应用NMR对野百合碱的肝毒性反应有了研究[42]，但未见应用代谢组技术研究野百合碱在大鼠体内注射后代谢变化的相关报道。

本论文选定MT诱导的肺动脉高压SD大鼠模型，利用基于核磁共振技术的代谢组学方法，分析MCT诱导大鼠PAH进程中不同时点血液的代谢特征，并探讨其产生的可能机制；同时探讨应用阿托伐他汀干预后，相关血液代谢特征改变及机制。目的是寻找出肺动脉高压早期诊断或病情变化可靠的评估指标，期望能从整体和系统的水平阐明肺动脉高压的代谢变化的规律，深入地理解肺动脉高压发病及阿托伐他汀药物治疗的分子机制。

本课题期望达到以下目标：MCT诱发的PAH大鼠发病的机制及代谢组学的变化，筛选出特征性代谢物，进一步为临床诊断提供可靠的指标；建立特征性代谢物与其信号调控通路关联性。探讨阿托伐他汀影响PAH大鼠的代谢调节机制，为临床疗效判定提供可靠的指标。本论文研究内容分三部分进行，各部分工作的重要性和意义在各章节前言中分述，在此不再展开叙述。

参考文献

[1] H. Tang, Y. Wang. Metabonomics: a revolution in progress[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics. 2006, 33(5): 401-417.

[2] A. Craig, J. Sidaway, E. Holmes, et al. Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabonomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat[J]. J. Proteome Res. 2006, 5(7): 1586–601.

[3] Fiehn, O., J. Kopka, P. Dormann, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11): 1157-1161.

[4] Fiehn 0. Metabolomies--the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Mol Biol. 2002, 48(l-2):155-171 .

[5] U. Sauer, M. Heinemann, N. Zamboni. Genetics. Getting closer to the whole picture[J]. Science. 2007, 316(5824): 550-551.

[6] Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, et al. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004, 5(9): 763−769.

[7] Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool[J]. Pharmacogenomics. 2007, 8(9): 1243-1266.

[8] Paige LA, Mitchell MW, Krishnan KR, et al. A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression[J]. Int J Geriatr Psychiatry. 2007, 22(5): 418-423.

[9] Weljie AM, Dowlatabadi R, Miller BJ, et al. An inflammatory arthritis-associated metabolite biomarker pattern revealed by 1H NMR spectroscopy[J]. J Proteome Res. 2007, 6(9): 3456-3464. [10]Niemann CU, Serkova NJ. Biochemical mechanisms of nephrotoxicity: application for metabolomics[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2007, 3(4): 527-544.

[11] Akira K, Imachi M, Hashimoto T. Investigation into biochemical changes of genetic hypertensive rats using 1Hnuclear magnetic resonance-based metabonomics[J]. Hypertens Res. 2005, 28(5): 425-430.

[12] Griffin JL, Nicholls AW. Metabolomics as a functional genomic tool for understanding lipid dysfunction in diabetes, obesity and related disorders[J]. Pharmacogenomics. 2006, 7(7):

1095-1107.

[13] Hodavance MS, Ralston SL, Pelczer I. Beyond blood sugar: the potential of NMR-based metabonomics for type 2 human diabetes, and the horse as a possible model[J]. Anal Bioanal Chem. 2007, 387(2): 533-537.

[14] Van Doorn M, Vogels J, Tas A, et al. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers[J]. Br J Clin Pharmacol. 2007, 63(5): 562-574.

[15] Kao HJ, Cheng CF, Chen YH, et al. ENU mutagenesis identifies mice with cardiac fibrosis

And hepatic steatosis caused by a mutation in the mitochondrial trifunctional proteinβ–subunit[J]. Hum Mol Genet. 2006, 15(24):3569-3577.

[16] Watson AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems[J]. J Lipid Res. 2006, 47(10): 2101-2111.

[17] Marchesi JR, Holmes E, Khan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease[J]. J Proteome Res. 2007, 6(2): 546-551.

[18] Carraro S, Rezzi S, Reniero F, et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2007, 175(10): 986-990.

[19] Coen M, O'Sullivan M, Bubb WA, et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis[J]. Clin Infect Dis. 2005, 41(11): 1582-1590. [20]Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, et al. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia[J]. Mol Psychiatry. 2007, 12(10): 934-945. [21]Humbert M, Morrell N W, Archer S L, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol.2004, 43 (12 Suppl S):13S–24S.

[22] Zaim an AL, Podow ski M, Medicherla S, et al. Role of the T GF-beta/ Alk 5 signaling pathway in monocrotaline- induced pulmonary h ypert en sion[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2008, 177(8): 896-905.

[23] Murakami K, Mathew R, H uan g J, et al. Smurf1 ub iquit in ligase causes down regul at ion of BMP recept ors and is induced in monocrot al ine and h ypoxia model s of pulmonary art erial hypert ension [J]. Exp Biol Med( Maywood). 2010, 235(7):805-813.

[24] Li XH, Peng J, Tan N, et al. Involvement of asymm etric dimethylarginin e and Rh o kinase in the vas cular remodeling inmonocr ot aline-induced pulm on ary hypert en sion [J]. Vascu l Pharmacol. 2010, 53(5-6): 223-229.

[25] Gui lluy C, E ddahib i S, Agard C, et al. RhoA an d Rho kinase activat ion in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2009, 179(12): 1151-1158.

[26] Lim KA, Kim KC, Cho MS, et al. Gene exp ress ion of endothelin 1 and endothel in recept or a on monocrotaline- induced pulmonary hypert ensi on in rat s af t er bosen tan t reatment [J].

Korean C irc J. 2010, 40 (9): 459-464.

[27] Nishida M, Okada Y, Akiyoshi K, et al. Rol e of endothel in ETB recept or in the pathogen esis of monocrotaline-induced pulm onary hypert ensi on in rats[J]. European Journal of Pharmacology. 2004, 496 (13): 159-165.

[28] Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, et al. Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right vent ricular hypert roph y in rats administered monocrotaline[J]. European Journal of Pharmacology. 1998, 355(1):33- 39.

[29] Ou ZJ, Wei W, H uang DD, et al. Larginine restores endoth elial nitric oxide synthase coupled act ivit y and attenuat esmonocrot aline induced pulmonary artery hypertension in rats

[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010, 298(6): E1131-1139.

[30] Kataoka M, Nagaya N, Sat oh T, et al. A long acting prostacycl in agonist with thromboxane inhibit ory act ivit y for pulmonary hypert ension[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2005, 172(12): 1575-1580.

[31] Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, et al. Single injection of a sustain ed release prostacy clinanalogimp roves pulm on ary hypertension in rats [J]. Am J Respir C rit Care Med. 2008, 177(2): 195-201.

[32] Tuder RM, Groves B, Badesch DB, et al. Exuberant endothelial cell growth and elements

Of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension[J]. Am J Pathol. 1994, 144(2):275–285.

[33] Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability[J]. Cardiovasc Res. 2000, 47(4): 648–657.

[34] Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins[J]. Circulation. 2000, 101(6): 207–213.

[35] Xie L, Lin Z, Sun M, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on the proliferation of vascular smooth muscle Cells in spontaneously hypertensive rats[J]. Chinese Journal of Pathophysiology. 2002, 18(7): 483–485.

[36] Lin Z, Xie L, Wu K, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on the myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats[J]. Natl Med J China. 2000, 80(13): 718–719.

[37] Lin Z, Xie L, Wu K, et al. Effects of fluvastatin on structure and function of resistant vessels in spontaneously hypertensive rats[J]. Acta Pharmacologica Sinica. 1999, 20(9): 855–860.

[38] Xie L, Ouyang Q, Zhao H, et al. Effect of Benazepril and Fluvastatin on L-type Calcium Channel a1C Expression in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats[J]. Chin J Hypertension. 2008, 16(6): 1100–1104.

[39] Yang Y, Wu X, Chen J, et al. Effects of fluvastatin on endothelium dependent vasodilatation function in elder hypertensives[J]. Chinese General Practice. 2003, 6(17): 32–34.

[40] Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2002, 166(10):1403–1408.

[41] Liangdi Xie, Peisen Lin, Hong Xie, et al. Effects of Atorvastatin and Losartan on Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Remodeling in Rats[J]. Clinical and Experimental Hypertension. 2010, 32(8): 547–554.

[[42] Mingatto FE,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mingatto%20FE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18835426) [Maioli MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Maioli%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18835426) [Bracht A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bracht%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18835426) et al. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver[J]. Toxicology Letters. 2008, 182(1-3):115–120.

目 录

[摘 要](#_Toc686260440) 3

**[Abstract](#_Toc686260441)** 3

[ng](#_Toc686260442) 3

[前 言](#_Toc686260443) 3

[参考文献](#_Toc686260444) 4

[第一部分 野百合碱诱发的肺动脉高压大鼠](#_Toc686260445)**[NMR](#_Toc686260445)** 5

[一 、引言](#_Toc686260446) 5

[二 、实验材料与方法](#_Toc686260447) 5

[三 、结果](#_Toc686260448) 8

[四 、讨 论](#_Toc686260449) 19

[五 、结论](#_Toc686260450) 20

[参考文献](#_Toc686260451) 20

[第二部分 阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠](#_Toc686260452)**[NMR](#_Toc686260452)** 21

[一、 前言](#_Toc686260453) 21

[二、 实验材料与方法](#_Toc686260454) 21

[三、 结 果](#_Toc686260455) 21

[四、 讨论](#_Toc686260456) 30

[五、 结论](#_Toc686260457) 30

[参考文献](#_Toc686260458) 30

[参考文献](#_Toc686260459) 46

[全文总结](#_Toc686260460) 47

[参考文献](#_Toc686260461) 49

[缩略词表](#_Toc686260462) 49

# 第一部分 野百合碱诱发的肺动脉高压大鼠**NMR**

**代谢组学的变化**

## 一 、引言

肺动脉高压(Pulmonary Arterial Hypertension, PAH)是指各种原因引起[的静息状态下右心导管测得的肺动脉](http://baike.baidu.com/view/814805.htm)平均压（mean Pulmonary Arterial

Pressure[，mPAP）≥25mmHg的一组临床病理生理](http://baike.baidu.com/view/953210.htm)综合征。其发病机制非常复杂，至今尚未完全阐明。绝大部分人认为PAH的主要发病机制是平滑肌细胞、成纤维细胞以及内皮细胞的增殖迁移，引起肺血管重塑，进而导致肺小动脉管腔的阻塞。在影响和促进PAH形成的因素中，已经被证实导致肺动脉压力持续增高的主要原因是肺血管的重塑[1]。在分子水平的许多研究中已有提示肺血管内皮功能受损与肺血管收缩增强和结构重塑密切相关[2-3]。

近年来在心血管疾病的研究中，运用代谢组学方法寻找疾病的生物标记物，比传统的检测方法更加敏感，提高了疾病的确诊率。其在医学领域的应用不仅可用于诊断，还可以评估疾病的临床病程、患者的预后、手术或者药物的疗效等，而了解代谢的特征模式还可以帮助人们了解疾病的病理进程，拓宽对特殊疾病的认识。脂质代谢紊乱是诱发心血管疾病的重要诱因之一。有研究[4]采用气相色谱-质谱法(gas chromatogra-phy-mass spectrometry, GC-MS)对大鼠高脂饮食前后血脂水平进行检验，发现多种高脂血症潜在生物标记物，如β-羟基丁酸、酪氨酸和肌酸酐等。另外有研究[5]运用GC/MS分析法检测到有21种化合物可作为动脉粥样硬化发展的生物标记物。这些数据提供了高胆固醇血症发展为动脉粥样硬化病理生理过程的新信息。Brindle等[6]应用基于1H-NMR的代谢组学对不同血压组患者进行血清代谢谱的研究，发现不同血压人群的血清代谢谱图有明显差异，并进一步发现这种差异主要是由于它们的脂类代谢不同造成的。Lu等[7]用代谢组学分析了自发性高血压大鼠(spontaneously hy-pertensive rats, SHR)与

正常血压小鼠的血浆代谢物，以及SHR与年龄相关的代谢变化，结果表明SHR血浆中的非饱和脂肪酸含量明显增高，该相关性提示游离脂肪酸是高血压疾病的潜在生物标记物。另外通过测定用药后心脏、血浆和脂肪组织脂类代谢的变化，阐明药物作用靶点及作用过程，也可揭示药物的作用机制[8]。研究发现罗格列酮对脂类代谢组的影响是通过抑制肝脏-血液脂交换，达到降低血脂浓度从而改变心脏的磷脂代谢[9]。

野百合碱是一种植物毒素的生物碱，是用来制作肺动脉高压动物模型的常用药物。研究发现在大剂量野百合碱给药后，大鼠发生肝损伤。通过代谢组学方法能检测具有结合到细胞DNA和蛋白质的烷基剂[10]。体外实验亦证实了野百合碱在不同状态下可对糖代谢各途径产生影响，从而使肝脏能量代谢受到抑制[11]。本研究采用小剂量（60mg/Kg）MCT给予大鼠腹腔注射构建肺动脉高压的模型，观察不同时点肺动脉重塑变化及代谢模式的影响，并将此做为后续代谢及分子机制探讨的基础。

## 二 、实验材料与方法

### **1** 实验材料

### 1.1 实验动物

本实验所用Sprague-Dawley大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，许可证号：SCXK（沪）2003-0003。饲养在本院动物房，恒温（22±2℃）、恒湿

（55％±5％）、人工光照明暗各12小时。

### 1.2 实验材料与仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 野百合碱 | Sigma 公司,美国 |
| 右心导管 | 中国协和医科大学生理教研室，中国 |
| RM6240BD 生理多导记录仪 | 四川成都仪器厂，中国 |
| YT-100 型压力换能器 | 四川成都仪器厂，中国 |
| CMIAS-B 多功能彩色病理图像分析系统 | 北京航空航天大学图像中心，中国 |
| 10％水合氯醛 | 本院药剂科 |

|  |  |
| --- | --- |
| 肝素钠 | 本院药剂科 |
| 液体石蜡 | 上海谱振生物科技有限公司，中国 |
| 松节油 | 上海信然生物技术有限公司，中国 |
| 梯度乙醇溶液 | 上海信然生物技术有限公司，中国 |
| 盐酸乙醇分化液 | 南京森贝伽生物科技有限公司，中国 |
| 苏木素染液 | 上海研域生物科技有限公司，中国 |
| 稀氨水 | 济南鑫利化工有限公司，中国 |
| 二甲苯溶液 | 上海研域生物科技有限公司，中国 |
| 封片剂 | 上海标本模型厂，中国 |
| 重水（99.9％氘代） | Cambridge Isotopic Laboratory，英国 |
| 25%氘代甲醇 | Cambridge Isotopic Laboratory，英国 |
| 75%氘代氯仿 | Cambridge Isotopic Laboratory，英国 |
| 链脲佐菌素（streptozotocin, STZ） | Sigma 公司，美国 |
| 磷酸氢二钠 | 上海国药集团化学试剂有限公司，中国 |
| 柠檬酸 | 上海国药集团化学试剂有限公司，中国 |
| 柠檬酸钠 | 上海国药集团化学试剂有限公司，中国 |
| 纯水 | Millipore 公司，美国 |
| Unity INOVA 600 核磁共振谱仪 | Varian 公司，美国 |
| MICRO 22R Hettich 离心机 | Hettich 公司，德国 |

### **2** 实验方法

### **2** 实验方法

### 2.1 动物实验分组设计及肺动脉高压模型的建立

雄性清洁级Sprague－Dawley大鼠80只，体重200～230g，随机分为两组：正常对照组(Ctr组)、肺动脉高压组（PAH组）。首先将MCT溶于适量0.1N盐酸中，然后以0.1N氢氧化钠调节，使pH至7.2，最后用生理盐水配置成最终浓度为2％的溶液。PAH组给予一次性腹腔注射MCT 60mg/Kg，对照组给予1ml生理盐水腹腔注射。

### 2.2 右心导管法测定肺动脉平均压（MPAP）

两组中均随机选择8只大鼠，分别于第1天、1周、2周、3周、4周采用我们先前报道的方法进行大鼠MPAP的测量。具体方法简要说明如下：首先大鼠腹腔注射

10％水合氯醛（4ml/Kg）麻醉后，做鼠颈部正中切口并予以暴露右颈外静脉和右颈总静脉，在近心4mm处向近心端呈45°角斜行剪开1/3的血管直径，并迅速沿此切口方向将导管插入血管0.5～1.0cm，不断调整导管尖端朝向就可以顺畅通过。然后继续进入2～3cm到达右心房后后再缓慢提拉转动导管，使其进入右心室，出现典型的右心室波形后再进入5cm就可以到达肺动脉。当出现典型的肺动脉压力波形时，予以稳定5分钟后记录肺动脉收缩压。

### 2.3 右心室肥厚指数（RVHI）的测定

按照前述分组采用腹腔注射过量10％水合氯醛来处死大鼠。然后取大鼠整个心脏，并分离去左、右心房、大血管根部，将右心室游离壁剪下用滤纸吸掉水分后予以右心室游离壁（RV）及左心室+室间隔（LV+S）重量的称量，最后计算右心室肥厚指数[RVHI＝RV/(LV+S)]。

### 2.4 肺小动脉血管图像分析

每张切片在距离肺门大约2mm处随机选取直径100-200µm范围的肺小动脉六支，运用ipp6.0图像分析软件测定管壁厚度（Wall Thickness, WT）、管径

（External Diameter, ED）、血管总面积（Total Area, TA）、血管腔面积（Lumen

Area，LA）。根据上述数据，计算出肺小动脉管壁厚度占管径的百分比WT%（WT%=2

×WT/ED×100%），及管壁面积（Wall Area, WA）占血管总面积的百分比WA%[WA%=(TA-LA) /TA×100%]。

### **2.5** 代谢样本收集

为了考察MCT所致PAH组大鼠代谢模式的变化轨迹，我们分别收集Ctr组、PAH组大鼠1天、7天、14天、21天、28天的血液，然后将血液样本用5000转5分钟离心后置入-80℃冰箱保存。

### **2.6** 样本准备与核磁共振谱采集

将300μL解冻后的血清置于碎冰上，与250μLD2O配制的磷酸缓冲液混合（0.2 mol/L Na2HPO4/ NaH2PO4, pH =7.4），以减少因pH改变而导致的化学位移差异。将混合后的血清离心12000转4℃下离心10 min，取500μL上清液转移至5 mm的NMR管中。25℃下采集血清NMR谱(Bruker Avance III 600核磁共振仪，德国)，采用脉冲序列为：cpmgpr1d(RD-90°-(τ-180°-τ) n-acq] (Bruker Biospin pluse program library)，扫描次数256次，空扫16次，谱宽为20ppm，2nτ=120ms，以消除来自高分子量化合物的宽包信号。fid信号加0.3 Hz窗函数进行Fourier变换。随后进行手动的相位和基线校正，以乳酸(CH3, δ1.33ppm)定标。

### **2.7** **NMR**谱处理与模式识别分析

为确定NMR谱中所有代谢物的信息，使用MestReNova6.1（MestreLab Research S. L, Spain）软件对一维氢谱进行分步积分，分步积分间距以0.003ppm划分，设定积分区域（bin）。血清的积分区域为0.6-9.0 ppm，为了消除水峰压制和尿素交叉饱和(cross-saturation)效应对积分的影响，谱图中δ4.7-6.0

ppm积分面积定义为零。每个谱图中，所有积分值均以该谱的总面积的基准进行归一化校正，校正后的数据导入SIMCA-P+12.0软件(Umetrics AB, Sweden)进行模式识别分析。首先，用主成分分析（PCA）来区分不同组别的代谢模式，前两个主成分可以代表矩阵中最大的信息变量，由它们构建的积分图（scores plot）上每一个点代表一个样本，每组在得分图上聚集的趋势反映其代谢模式的特征；正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）得分图由第一预测主成分（tp[1]）和一个正交成分（to[1]）构建。以OPLS-DA模型筛选特征性代谢物，以p = 0.05和p=0.01的相关系数作为相关系数的临界值和变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值作为具有统计意义变量的选择条件，凡是相关系数的绝对值大于临界值和VIP值大于1的代谢物确认为对分组有贡献的代谢物。R2X (cum)和R2Y (cum)分别指示所建模型主成分所能解释的X变量（分段积分）和Y变量（分组信息）变异的百分比，Q2 (cum)和R2Y (cum)变异的累积百分比指示模型的可靠程度，R2Y（cum）和Q2 (cum)数值越接近1，模型越可

靠。

### 2.8 统计学方法

计量资料以均数±标准差（*X*±*S）*表示。不同组间比较采用成组t检验。统计学处理由spss11.0完成，*P*<0.05表示差异有统计学意义，*P*<0.01表示差异有非常显著意义。

## 三 、结果

### **1** 野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠肺动脉平均压、右心室肥厚指数、**WT%**、

**WA%的变化**

1天、7天时（图1, A、B）PAH组与Ctr组相比，MPAP、RVHI、WT%、WA%均无统计学意义（P> 0.05）。2周时（图1, C）PAH组与Ctr组相比，MPAP及RVHI并无明显升高（P> 0.05）, PAH组肺小动脉管壁厚度占管径的百分比（WT％）和管壁面积占血管总面积的百分比（WA％）均明显高于Ctr组（P<0.05）。3周时

（图1, D）PAH组与Ctr组相比，MPAP及RVHI有明显升高（P<0.05）。4周时（图

1，E）肺动脉高压组肺小动脉管壁厚度占管径的百分比（WT％）和管壁面积占血管总面积的百分比（WA％）均明显高于对照组（P<0.05）。以上结果揭示了肺动脉重塑先于肺动脉压力升高出现。

45

40 50

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

35 45

30 40

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

35

25 30

1d后

7d后

20 25

15 20

10 15

10

5 5

0 0

A B

70

\*

\*

60 80

\*

\*

\*

\*

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

70

50 60

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

40 50

14d

21d后

30 40

20 30

20

10

10

0 0

C D

90

\*

\*

\*

\*

80

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

70

60

50

28d后

40

30

20

10

0

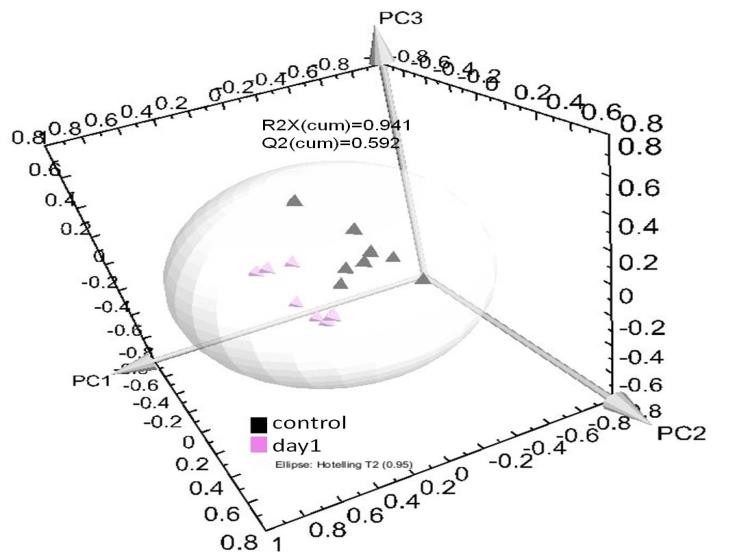
E

**Fig1：野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠MPAP、RVHI、WT%、WA%的变化**

注：\*P<0.05, PAH组VS Ctr组；MPAP：肺动脉平均压；RVHI：右心室肥厚指数；WT%：肺小动脉管壁厚度占管径的百分比；WA%：肺小动脉管壁面积占血管总面积的百分比。A：表示1d后；B：表示7d后；C：表示14天后；D：表示21天后；E：表示28天后。

### **2** 野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠代谢模式的变化

### 2.1

野百合碱对正常大鼠代谢模式的急性影响

**Fig 2 PAH 1d组与Ctr组主成分分析图（PCA score plot）**

图注：Day1指代PAH 1d组，control指代Ctr组。R2X (cum)和R2Y (cum)分别指示所建模型主成分所能解释的X变量（分段积分）和Y变量（分组信息）变异的百分比，Q2 (cum)是正交验证的R2X(cum)和R2Y

（cum）变异的累积百分比，指示模型的可靠程度；R2Y（cum）和Q2 (cum)数值越接近1，模型越可靠。

从图2中可以看出注射野百合碱1天后，SD大鼠有了应激性的代谢反应。使用正交的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使control和day1组的血清的

代谢模式在第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图3，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=15个，所以在显著性p=0.05和p=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为

0.514和0.641.



**Fig 3 （左）Ctr组与PAH 1d组的OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（Fig3, 右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表1。

**表1** **Ctr组与PAH 1d组差异性代谢物详细情况表**

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Day1 vs control |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.04 | Val | 0.7904 | 2.6067 | ↑↑ |
| 1.015 | Ile | 0.9479 | 2.3676 | ↑↑ |
| 0.985 | Leu | 0.6455 | 2.2451 | ↑↑ |
| 1.195 | 3-HB | 0.7429 | 3.2775 | ↑↑ |
| 1.276 | LDL/VLDL | 0.6830 | 5.1302 | ↓↓ |
| 1.922 | Acetate | 0.7361 | 2.323 | ↑↑ |
| 2.05 | Nac | 0.8540 | 2.9696 | ↑↑ |
| 2.143 | Met | 0.6189 | 2.594 | ↑↑ |
| 2.23 | Acetone | 0.9540 | 2.6594 | ↑↑ |
| 2.28 | Ace | 0.7691 | 2.2030 | ↑↑ |
| 2.455 | Carnitine | 0.7621 | 1.2872 | ↑↑ |
| 3.21 | Choline | 0.9675 | 5.0497 | ↑↑ |
| 3.26 | TMAO | 0.7808 | 8.0002 | ↑↑ |
| 3.434 | Tau | 0.7095 | 3.5665 | ↓↓ |
| 3.563 | Gly | 0.8256 | 5.220 | ↑↑ |
| 3.67 | Glycerol | 0.8312 | 2.2619 | ↑↑ |
| 3.41 | Glucose | 0.6130 | 2.2589 | ↓ |
| 3.905 | Betaine | 0.9074 | 3.825 | ↑↑ |
| 3.983 | Hip | 0.9254 | 2.1896 | ↑↑ |

注：\*↑/↓表示VIP> 1 & 0.641> |r|> 0.514的代谢物增加或减少；↑↑/↓↓表示VIP> 1 & |r|> 0.641的代谢物增加或减少

结果显示，注射野百合碱后1天，大鼠出现急性的代谢反应，代谢模式发生明显的改变。通过对相关代谢物的指认，我们发现造成代谢模式变化的主要代谢物包括：1）TMAO、胆碱浓度升高，而牛磺酸浓度下降；2）葡萄糖水平升高，柠檬酸水平升高而乳酸浓度下降，提示糖代谢出现明显变化；3）BCAA浓度均显著升高，提示支链氨基酸的降解加强；另外甘氨酸的变化也提示氨基酸代谢的增强；

4）酮体（3-HB）浓度显著升高，并且脂质（LDL和VLDL）浓度下降，而甘油浓度升高提示了脂肪储备的动员过程加强。5）肉碱升高提示脂肪酸β氧化此外，大鼠血液中一些酸性物质浓度的升高，如乙酸、酮体等，可能造成急性的代谢性酸中毒；牛磺酸和甘氨酸浓度升高提示胆汁酸代谢过程的变化，与脂肪代谢和肝细胞损伤密切相关。

我们进一步通过代谢物富集分析（Enrichment analysis），探讨影响急性代谢模式变化的最重要的代谢通路（图4），发现在注射野百合碱造成的急性的代谢变化中，支链氨基酸的降解具有重要意义。

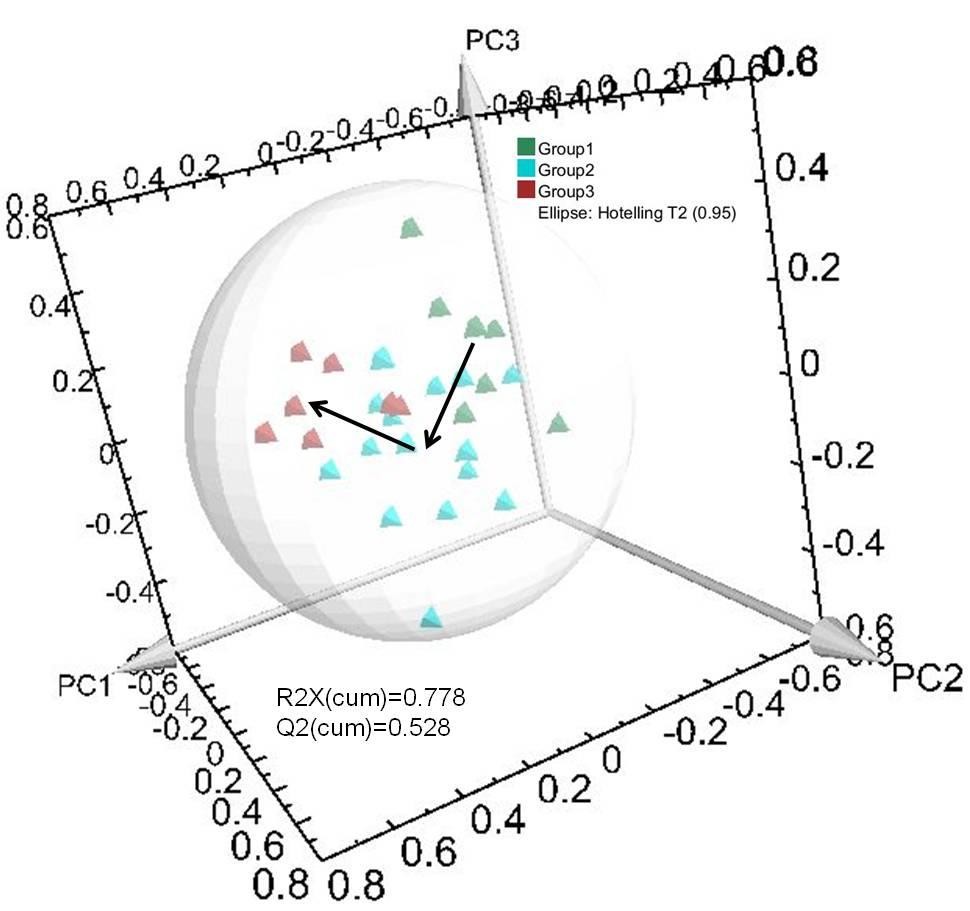


**Fig 4 Ctr组与PAH 1d组代谢物富集分析图**

### 2.2 野百合碱所致肺动脉高压大鼠模型的血清代谢模式的变化轨迹

注射野百合碱后，大鼠血清中的代谢模式随着时间的变化而变化（图5）从得分图上我们可以看出，大鼠血清的代谢模式可以分成三组，分别是第1 周

（Week1组），第2、3周（Week2-3组）和第4周（Week4组）。



**Fig 5野百合碱诱导的PAH大鼠不同时点血清PCA得分图**

图注：Group1指代MCT注射后1周组（Week1组）；Group2指代MCT注射后2-3周组（Week2-3组）；Group3指代MCT注射后4周组（Week4组）

#### 2.2.1 control组与Week1组的差异代谢物

使用正交的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使control和week1组的血清的代谢模式在第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图6，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=15个，所以在显著性P=0.05和P=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为0.514和0.641。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图6，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表2。与对照组比较，野百合碱注射后1周的代谢结果表明是大鼠机体对野百合碱所致损伤的代偿修复反应。



**Fig 6 （左）Ctr组与PAH week1组（group1组）的OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表2 Ctr组与PAH week1组差异性代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week1 vs control |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.919 | LDL/VLDL | 0.8446 | 1.2989 | ↓↓ |
| 1.048 | Val | 0.6991 | 1.6514 | ↑↑ |
| 1.225 | 3-HB | 0.8013 | 1.184 | ↓↓ |
| 1.484 | Ala | 0.8367 | 2.9254 | ↓↓ |
| 1.721 | Lys | 0.8237 | 1.0815 | ↓↓ |
| 1.921 | Acetate | 0.8613 | 2.5941 | ↑↑ |
| 2.044 | Nac | 0.6861 | 2.3061 | ↓↓ |
| 2.135 | Met | 0.7734 | 1.9620 | ↓↓ |
| 2.231 | Acetone | 0.7602 | 1.2626 | ↑↑ |
| 2.279 | Ace | 0.8202 | 1.7410 | ↑↑ |
| 2.372 | Pyruvate | 0.5746 | 1.9539 | ↑ |
| 2.455 | Carnitine | 0.8420 | 1.2375 | ↓↓ |
| 3.04 | Cr | 0.6618 | 2.6367 | ↓↓ |
| 3.20 | Choline | 0.8106 | 2.0048 | ↑↑ |
| 3.25 | Glucose | 0.6954 | 4.9553 | ↑↑ |
| 3.553 | Gly | 0.6415 | 2.7904 | ↑↑ |
| 3.665 | Glycerol | 0.8541 | 3.2694 | ↑↑ |

注：\*↑/↓表示VIP> 1 & 0.641> |r|> 0.514的代谢物增加或减少；↑↑/↓↓表示VIP> 1 & |r|> 0.641的代谢物增加或减少

#### 2.2.2 Week1组与Week2-3组的差异代谢物

从图3可得，week 1组与week2-3组是可以区分的，使用正交的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使week 1组与week2-3组的血清的代谢模式在第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图7，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=22个，所以在显著性P=0.05和P=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为0.423和0.537。筛选



出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图7，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表3。

**Fig 7（左）PAH week1组（group 1组）与PAH week2-3组（group 2组）的OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表 3 PAH week 1组与PAH week2-3组差异性代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week2-3 vs  week1 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.844 | LDL/VLDL | 0.6378 | 2.4007 | ↑↑ |
| 1.048 | Val | 0.4659 | 2.0114 | ↓ |
| 1.225 | 3-HB | 0.5633 | 1.2308 | ↑↑ |
| 1.484 | Ala | 0.5205 | 2.2247 | ↑ |
| 1.721 | Lys | 0.8237 | 1.0815 | ↑↑ |
| 1.922 | Acetate | 0.5351 | 1.7895 | ↓ |
| 2.044 | Nac | 0.4639 | 2.0305 | ↑ |
| 2.135 | Met | 0.6971 | 3.35 | ↑ |
| 2.231 | Acetone | 0.5602 | 1.2626 | ↓↓ |
| 2.279 | Ace | 0.6202 | 1.7410 | ↓↓ |
| 2.371 | Pyruvate | 0.4746 | 1.9306 | ↓ |
| 2.455 | Carnitine | 0.6418 | 1.6755 | ↑↑ |
| 3.04 | Cr | 0.5061 | 2.9501 | ↑ |
| 3.20 | Choline | 0.5120 | 1.6760 | ↓ |
| 3.25 | Glucose | 0.5004 | 3.5102 | ↓ |
| 3.553 | Gly | 0.4432 | 1.8705 | ↓ |
| 3.665 | Glycerol | 0.8858 | 4.1837 | ↓↓ |
| 1.336 | Lac | 0.5756 | 4.2257 | ↑↑ |

注：\*↑/↓表示VIP> 1 & 0.537> |r|> 0.423的代谢物增加或减少；↑↑/↓↓表示VIP> 1 & |r|> 0.537的代谢物增加或减少

#### 2.2.3 Week2-3组与Week4组的差异代谢物

使用OPLS-DA找出Week2-3组与Week4组之间的差异代谢物。使用正交的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使Week2-3组和Week4组的血清的代谢模式在第

一预测主成分（tp1）上很好的区分（图8，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in

projection，VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=22个，所以在显著性p=0.05和p=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为0.423和0.537。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图8，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表4。



**Fig 8（左）PAH week2-3组（group 2组）与PAH week 4组（group 3组）的OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表 4 PAH week 2-3组与PAH week 4组差异性代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week 4 vs week 2-3 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.841 | LDL/VLDL | 0.4792 | 1.7729 | ↓ |
| 1.04 | Val | 0.6914 | 2.7642 | ↑↑ |
| 0.985 | Leu | 0.5412 | 1.4437 | ↑↑ |
| 1.018 | Ile | 0.6839 | 1.8605 | ↑↑ |
| 1.20 | 3-HB | 0.5168 | 1.3319 | ↑↑ |
| 1.33 | Lac | 0.7352 | 8.7719 | ↑↑ |
| 1.484 | Ala | 0.5144 | 2.8632 | ↑ |
| 2.231 | Acetone | 0.5825 | 1.6902 | ↓↓ |
| 2.279 | Ace | 0.5393 | 1.9849 | ↓↓ |
| 2.371 | Pyruvate | 0.5424 | 2.7834 | ↑↑ |
| 2.455 | Carnitine | 0.5178 | 1.3325 | ↑↑ |
| 3.04 | Cr | 0.5083 | 4.4815 | ↑ |
| 3.20 | Choline | 0.4954 | 2.2893 | ↑ |
| 3.25 | Glucose | 0.4436 | 4.3986 | ↓ |
| 3.665 | Glycerol | 0.5955 | 2.2213 | ↑↑ |

注：\*↑/↓表示VIP> 1 & 0.537> |r|> 0.423的代谢物增加或减少；↑↑/↓↓表示VIP> 1 & |r|> 0.537的代谢物增加或减少

## 四 、讨 论

### **1** 野百合碱对大鼠肺小动脉重塑的影响

PAH是多种因素导致的病理生理学改变，其易患因素包括环境因素、遗传标记、后天获得性因素，其病理变化主要特征是肺小血管痉挛、内膜增生及重塑和微血栓病灶的形成。肺动脉高压时，病理变化早期表现为肺小动脉肌性化、数量增多，肌性肺动脉中层明显增厚以及出现广泛收缩和动脉内膜细胞增生；晚期时表现为小动脉内膜纤维化增生、阻塞管腔、肌性肺动脉进一步肌化、以至闭塞，肺内血管床减少、丛样病变形成及坏死性动脉炎等[12]。这些病理变化均可导致PAH的发生，其中肺血管重构是PAH发生机制的重要组成部分。血管重构是机体为适应内外环境的变化，局部释放某些活性物质导致管壁肥厚和（或）狭窄等改变自身形态结构和功能变化，以及引起肺血管的顺应性（即运动时肺血管舒张和闭塞血管重新开放能力）下降和肺血管阻力增加，导致肺动脉压力的升高。在PAH发生过程中，肺动脉内皮功能受损导致抗增殖物质和血管舒张的表达下降[13]，而血管收缩和促增殖物质过表达促进肺血管收缩和重塑[14-15]。虽然肺动脉高压并不是真正意义上癌性的代名词，但是它有不正常及不可控制的细胞生成过程这样癌性增生的许多特征[16]。野百合碱是一类植物毒素生物碱，科研上常用于建立肝损伤及肺动脉高压的模型。研究发现大鼠超过150mg/kg剂量野百合碱给药后24小时就会发生肝损伤。野百合碱所致肝损伤有急性和慢性肝损伤阶段，首先是中央静脉内皮细胞、窦状内皮细胞以及肝实质细胞的损伤，然后出现肝静脉闭塞疾病或者导致窦状闭塞综合症[17]。MCT诱导的肝损伤的特点是小叶中心坏死、血窦扩张充血、出血、中央静脉内皮细胞损伤[18-19]和实质细胞肿胀和凋亡[2]。通过MCT造模观察，本课题再次证实了MCT可以成功构建肺动脉高压模型，并且肺血管重塑先于压力升高出现。我们发现2周时，WT％和WA％的明显增加，表明2周时肺动脉高压组大鼠的肺小动脉的平滑肌细胞发生明显的增生、肥厚，导致使肺血管内径显著减小，肺小动脉发生重塑；肺血管出现阻力增加、MPAP和RVHI的增高，证实右心室的后负荷增加，导致右心室的肥厚，这与本课题组前期结果是一致的。

### **2** 野百合碱对正常大鼠代谢模式的影响分析

本课题结果显示野百合碱注射后1天，大鼠出现急性的代谢模式变化，表现在葡萄糖、脂类浓度下降，支链氨基酸大量增加，提示糖类、脂类及蛋白质被大量分解供能。野百合碱对能量代谢的抑制作用是非常明确的，已经被证实细胞色素P-450单加氧酶参与野百合碱的代谢转运以及影响（至少是部分）氧消耗[20]。且野百合碱不是氧化磷酸化的典型抑制剂，因为在灌注肝脏内未观察到氧消耗的抑制，相反，有小幅的刺激效应，这种明显的差异反映了双氢野百合碱和其他可能的野百合碱代谢产物对线粒体呼吸作用和细胞色素P-450单加氧酶的叠加作用

[21]. 经肝脏代谢后的产物脱氢野百合碱( MCTP)还可通过对呼吸链复合体的非竞争性抑制作用，破坏线粒体膜电位、耗竭ATP[21]。脂肪酸的活化在胞液中进行，而催化脂肪酸氧化分解的酶系存在于线粒体基质，因此活化的脂酰CoA必须进入线粒体才能分解。脂酰CoA不能直接透过线粒体内膜，其脂酰基需经肉（毒）碱转运才能进入基质。线粒体内膜的两侧存在着肉毒碱脂酰转移酶Ⅰ及Ⅱ，在位于线粒体内膜外侧面的酶Ⅰ的催化下，脂酰CoA转化为脂肪酰肉毒碱，而移到膜内侧，进入膜内侧的脂肪酰肉毒碱又经酶Ⅱ的催化而重新转变成脂酰CoA，并释放出肉毒碱[22]。肉毒碱脂酰转移酶Ⅰ是限速酶，脂酰CoA进入线粒体是脂肪酸氧化的限速步骤[23-25]。肉毒碱是一种与胆碱结构大致相似的三甲基化氨基酸，它能促进活化的长链脂肪酸从胞浆转移到线粒体，并使其在线粒体内氧化处理生成ATP[26]。在本实验中肉碱明显增加，提示脂肪酸β氧化增强；缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸均明显升高，与蛋白质大量分解所致，表明支链氨基酸代谢具有重要的作用。结果还发现甘氨酸浓度升高而牛磺酸浓度下降，它们与胆汁酸的生物合成过程密切相关。胆汁酸是在肝脏由细胞色素P450介导的胆固醇氧化形成的。他们是牛磺酸、甘氨酸或硫酸或葡萄糖醛酸苷相结合，然后储存在胆囊中。胆汁酸对脂质代谢起到重要的作用，能够降低体内的胆固醇水平，有助于脂质在肠道的消化吸收。胆碱、甜菜碱、蛋氨酸升高，表明注射野百合碱后影响到胆碱代谢和蛋氨酸代谢。胆碱氧化的基本过程是胆碱在胆碱脱氢酶和甜菜醛脱氢酶二者共同作用下而生成甜菜碱的氧化过程。蛋氨酸代谢主要包括再甲基化途径和转硫二个途径。蛋氨酸再甲基化途径是胆碱经甜菜碱中间转变为S-腺苷甲硫氨酸的重要途径。而在蛋氨酸再甲基化途径中，高半胱氨酸能在甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶

的作用下，由甜菜碱提供活性甲基使转变为内源性的蛋氨酸。已经明确甜菜碱是胆碱通过胆碱氧化途径而生成的，然后通过蛋氨酸再甲基化途径间接参与合成S-腺苷甲硫氨酸，合成后的S-腺苷甲硫氨酸经甲基代谢后促进肉碱的合成（很好解释了前述的肉碱增加），从而脂肪酸的氧化得到激活。

糖、脂肪、蛋白质三大物质的代谢有共同的代谢通路，就是三羧酸循环和氧化磷酸化。乙酰辅酶A是这条代谢通路中重要的中间代谢产物，起到枢纽性的作用。产生的乙酰辅酶A最终可以通过彻底的氧化生成二氧化碳和水，并合成ATP，释放能量供机体需要；也可作为前体物质代谢合成脂肪酸、酮体、胆固醇及其衍生物等生理活性物质。乙酰辅酶A的代谢有四种结局：①是进入柠檬酸循环及进一步的电子传递链，最终完全氧化为CO2及H2O；②是生成胆固醇；③是脂肪酸代谢逆方向；④是生成3 -羟基丁酸、丙酮等酮体。在肝脏中3 -羟基丁酸是通过3-羟基丁酸脱氢酶催化的反应，由乙酰辅酶A合成的。乙酰乙酸加氢还原成β-羟丁酸，少量乙酰乙酸自发脱羧生成丙酮。酮体总量中约70%为β-羟丁酸，30%为乙酰乙酸，丙酮只占少量，丙酮可通过肾和肺排出。本实验发现3 -羟基丁酸、丙酮明显升高，提示大量乙酰辅酶A代谢为酮体，表明注射野百合碱后，脂质分解代谢加强，可能造成了大鼠的脂代谢异常和肝细胞受损。本实验中我们还发现

TMAO，NAC和乙酸的升高，这些指标都是细胞应激损伤的标志，提示在注射野百合碱之后，短时间内大鼠内环境出现急性紊乱，出现应激状态和细胞损伤。大量文献表明，氧化应激是动脉粥样硬化[27]、心力衰竭[28]、心室肥厚[29]，呼吸窘迫[30]，缺血再灌注损伤[31]很重要的发病机制，并且证实肺动脉高压的各种动物模型中出现氧化应激反应[32-34]。最近文献也报道了抗氧化剂可以减少白细胞对肺动脉的浸润、肺动脉平滑肌细胞的增殖、NADPH氧化酶诱导的氧化应激以及阻止发展至野百合碱所致的肺动脉高压和右心衰[35]。本课题提示在野百合碱注射后24小时，大鼠机体出现明显脂肪酸β氧化及糖类、蛋白质分解代谢，为其提供能量，同时出现了内环境急性紊乱、应激状态和细胞损伤。

野百合碱注射后1周，与对照组比较，在葡萄糖大量分解情况下葡萄糖水平升高，考虑存在糖原分解。体外实验也发现在野百合碱灌注后，糖异生及尿素形成的抑制作用只持续了几分钟，而糖原分解的刺激效应相对持久。肝糖原分解的

增加对线粒体ATP形成是一种所期望的补偿，这也是最近在离体线粒体中证实的双氢野百合碱所具有的作用[22]。

同样脂质（LDL和VLDL）浓度下降、乙酸浓度显著升高、甘油浓度升高，提示脂肪储备的动员加强。缬氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、甘氨酸等氨基酸的碳骨架分解后形成乙酰辅酶A，这些氨基酸的下降提示这几种氨基酸分解代谢加速，并会导致乙酰辅酶A形成增多，用于能量的供给。在本实验中肉碱明显下降，提示脂肪酸β氧化减弱。前面已经提到蛋氨酸再甲基化途径可以间接的参与S-腺苷甲硫氨酸的合成，进一步可以通过S-腺苷甲硫氨酸的甲基代谢而促进肉碱合成。本实验中蛋氨酸下降，可以解释肉碱合成减少。胆碱氧化的基本过程是胆碱在胆碱脱氢酶和甜菜醛脱氢酶作用下生成甜菜碱的氧化过程。1周组与Ctr组对比，NAC和乙酸出现下降，而TMAO虽然没有变化，但是1周组与1天组对比也是下降的，考虑氧化应激在此阶段已经下调。3 -羟基丁酸浓度是下降的，考虑乙酰辅酶A更多是进入柠檬酸循环及进一步的电子传递链，进行有氧氧化，最终完全氧化为CO2及H2O。对野百合碱注射后1周的代谢结果分析可以发现野百合碱注射后1周，β氧化途径被抑制；脂肪、氨基酸、葡萄糖动员供能，机体出现糖的有氧氧化。因此课题可提示野百合碱注射后1周的代谢结果是大鼠机体针对损伤的代偿修复反应，可以很好解释野百合碱注射后1周并未发生肺血管重塑的原因。

与野百合碱注射后1周比较，野百合碱注射后2周、3周发现改变较大的代谢物是葡萄糖水平下降，乳酸升高，甘油下降。葡萄糖水平下降，乳酸升高，考虑与Warburg效应有关。已经证实warburg效应在大多数肿瘤细胞中都存在，Warburg效应有助于肿瘤细胞获取足够的ATP能量，以维持细胞生存。1分子葡萄糖通过氧化磷酸化途径生成36分子ATP，通过糖酵解途径生成2分子ATP，糖酵解大约只有氧化磷酸化途径的5%。因为糖酵解产生的ATP比线粒体呼吸产能的效率低的多，故肿瘤细胞代偿性地拥有一种较正常细胞更加高效的葡萄糖摄取和利用机制

[36-37]。肿瘤细胞消耗大量葡萄糖的同时，不可避免地产生大量的乳酸。肿瘤组织

的这种能量代谢改变与恶性肿瘤组织酶谱改变特别是糖酵解关键酶的改变及缺氧微环境等有关[38]。代谢改变是肿瘤细胞的特点[36-37]，而正常细胞利用线粒体呼吸作用来产生能量，但大部分的肿瘤细胞却优先利用有氧糖酵解[39]。实际上肺动

脉高压出现血管的重塑和肿瘤一样是由于细胞凋亡与增生的平衡的结果[40]。本阶段又出现肉碱升高，可以提示脂肪酸仍被大量β氧化。已经表明在肺动脉高压时，脂肪酸β氧化可抑制导致糖有氧氧化/糖酵解比值增加，涉及到Randle循环（糖

--脂肪酸循环），从而逆转糖酵解环境和线粒体超极化，从而促进线粒体依赖性凋亡[1]。和从丙酮酸产生的乙酰辅酶A（CoA）一样，脂肪酸进入线粒体后通过β

-氧化可生成乙酰CoA也可以进入Krebs循环。Randle循环控制供给线粒体作为燃料的碳水化合物和脂肪酸之间的相对平衡，而丙酮酸脱氢酶在Randle循环调节反馈机制中是最关键的。丙酮酸脱氢酶被抑制，就会激活脂肪酸氧化，反之亦然[40]，并且丙酮酸脱氢酶被抑制后，糖的有氧氧化会被抑制。PAH的血管表现为糖酵解，就像癌症一样，在活体内（体内正电子发射断层成像扫描）表明会增加葡萄糖的摄取[40]。虽然葡萄糖代谢增加，被认为是推动肿瘤细胞生长的能量需求。但高增殖的肿瘤细胞需要额外的生物合成前体供应，需要谷氨酰胺和/或丙酮酸羧化以及其他诸如脂肪酸类物质的需求，并不全自于葡萄糖代谢这点是明确的[41]。因此可以推断β氧化，GO/GLY比值（糖有氧氧化/糖酵解）会下降，从而抑制凋亡，增殖增加[42]。二者结果导致增殖增加，凋亡减少，导致肺血管重塑加剧。此阶段多种氨基酸升高，提示蛋白质进一步分解供能。β氧化产生的乙酰辅酶A并没有进入柠檬酸循环及进一步的电子传递链，而更多的生成3 -羟基丁酸等酮体，表现为3 -羟基丁酸升高。我们实验中发现：1周时未出现肺血管重塑，2周时出现大鼠肺小动脉重塑，3周时肺小动脉的重塑更明显并出现肺动脉压力的升高，2周与3周的代谢模式比较没有出现明显的改变，因此我们可以推断肺动脉压力升高并不是独立的病理生理过程，而是肺血管重塑到一定程度的结果。Week2-组与

Week1组比较出现明显代谢模式改变，这与大鼠肺小动脉的重塑有明显相关性。从代谢组学分析来看，Week2-3组出现的warburg效应可能是产生肺动脉血管重塑这一病理结果最重要的原因。

野百合碱注射后4周，与野百合碱注射后2、3周比较，肉碱继续升高，提示脂肪酸继续被大量β氧化。葡萄糖水平持续下降，乳酸持续升高，考虑与Warburg效应持续有关。慢性组织缺氧相关的肺动脉高压和糖酵解、葡萄糖氧化及脂肪酸氧化有直接的联系[32]。

从野百合碱注射后代谢模式变化总体来看，我们认为野百合碱注射后在肝脏引起肝细胞损伤，并引起应激反应，而后涉及到氨基酸、脂肪、糖代谢的异常。尤其脂肪酸大量β氧化加强，糖的有氧氧化降低，Warburg效应在病情发展过程中占有极其重要的位置，GO与GLY比值决定了细胞增殖和细胞凋亡。肉碱、β-羟丁酸、柠檬酸升高，乙酸、丙酮下降，伴随着肺血管重塑出现，并且随着病情发展，呈正相关。由于是体内试验，影响因素较多，是否这些指标可以作为野百合碱所致肺动脉高压早期诊断的指标尚不能完全明确，但是可以明确的是这些指

标变化可以作为病情的恶化的参考指标。

## 五 、结论

1、研究证实野百合碱（MCT）可以成功建立肺动脉高压模型，2周就开始出现肺血管重塑，肺血管重塑先于压力升高。

2、注射野百合碱后大鼠机体不同时点出现不同的代谢模式，出现应激状态和细胞损伤；针对损伤的代偿修复反应；脂肪酸β氧化和Warburg效应；

3、肺动脉压力升高并不是独立的病理生理过程，而是肺血管重塑到一定程度的结果。大鼠肺小动脉的重塑与2、3周出现脂肪酸β氧化和Warburg效应代谢模式改变密切相关；

4肉碱、β-羟丁酸、柠檬酸出现升高，乙酸、丙酮出现下降，这些指标的变化可以作为病情的恶化的参考指标。

参考文献

[1] Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. Journal of the American College of Cardiology. 2004, 43(12 Suppl S): 13S-24S.

[2] Xu W, Koeck T, Lara AR, et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2007, 104(4): 1342–1347.

[3] Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation[J]. Respir Res. 2009, 13: 10: 95. [4] Zhang Q, Wang G, AJ, et al. Metabonomic profiling of diet-induced hyperlipidaemia in a ratmodel[J]. Biomarkers. 2010, 15(3): 205-216.

[5] Zha W, A J, Wang G, et al. Metabonomic characterization of early atherosclerosis in hamsters with induced cholesterol[J]. Biomarkers. 2009, 14(6): 372-380.

[6] Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, et al. Application of chemometrics to 1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension[J]. Analyst. 2003, 128(1): 32-36.

[7] Lu Y, A J, Wang G, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension-and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats[J]. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008, 22(18): 2882-2888. [8] 王泳钦, 钱令嘉, 姚林. 代谢组学在心血管疾病研究中的应用. 现代预防医学. 2009, 36（6）: 1172-1173.

[9] Watkins SM, German JB. Toward the imp lementation of metabolomic assessments of human health and nutrition[J]. Curr Op in Biotechnol. 2002, 13(5): 512-516.

[10] Fábio Er minio Mingattoa, Marcos Antonio Maiolia, Adelar Brachtb, et al. Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver[J]. Toxicology Letters. 2008, 182(10): 115-120.

[11] Akira K, Mitome H, Imachi M, et al. LC-NMR identification of a novel taurine-related

Metabolite observed in(1) H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats[J]. Pharm

Biomed Anal. 2010, 51(5): 1091-1096.

[12] Gaine S. Pulmonary hypertension[J]. JAMA. 2000, 284(24): 3160-3168.

[13] Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, et al. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia[J]. Circulation. 2006, 113(15): 1857-1864.

[14] Mandegar M, Fung YC, Huang W, et al. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension[J]. Microvasc Res. 2004, 68(2): 75-103.

[15] Perros F, Montani D, Dorfmuller P, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2008, 178(1): 81–88.

[16] Rai PR, Cool CD, King JAC, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2008, 178(6): 558–564.

[17] Copple, B. L., Ganey, P. E., Roth, R. A.. Liver inﬂammation during monocrotaline hepatotoxicity[J]. Toxicology 190(3): 155–169.

[18] DeLeve LD, MsCuskey RS, Wang X, et al. Characterization of a reproducible rat model of hepatic venoocclusive disease[J]. Hepatology. 1999, 29(6): 1779–1791.

[19] Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, et al. Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure[J]. Toxicol. Sci. 2004, 77(1): 172–182.

[20] Reid MJ, LaméMW, Morin D, et al. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of 14 C-monocrotaline in rat liver microsomes[J]. J. Biochem. Mol. Toxicol. 1998, 12(3): 157–166.

[21] Min gatto FE, Dorta DJ, dos Santos AB, et al. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting f or hepatot oxicity of monocrotaline[J]. Toxicon. 2007, 50 (5): 724-730.

[22] McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis[J]. Eur J Biochem. 1997, 244(1): 1–14.

[23] Mandarino L, Tsalikian E, Bartold S, et al. Mechanism of hyperglycemia and response to treatment with an inhibitor of fatty acid oxidation in a patient with insulin resistance due to antiinsulin receptor antibodies[J]. J Clin Endocrinol Metab. 1984, 59(4): 658–664. [24] Ratheiser K, Schneeweiss B, Waldhäusl W, et al. Inhibition by etomoxir of carnitine palmitoyltransferase I reduces hepatic glucose production and plasma lipids in

Non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Metabolism 1991, 40(11):1185–1190. [25]Hübinger A, Knode O, Susanto F, et al. Effects of the carnitine-acyltransferase inhibitor

Etomoxir on insulin sensitivity, energy expenditure and substrate oxidation in NIDDM[J]. Horm Metab Res 1997, 29(9):436–439.

[26] Bremer J. Carnitine-metabolism and functions[J]. Physiol Rev. 1983, 63(4): 1420–1480. [27] Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. Am J Cardiol. 2003, 91(3A): 7A-11A.

[28] Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species[J]. Cardiovasc Res. 2007, 75(4): 770-781.

[29] Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010, 298(3): H1038-H1047.

[30] Weiland JE, Davis WB, Holter JF, et al. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome[J]. Clinical and pathophysiologic significance. Am Rev Respir Dis. 1986, 133(2): 218-225.

[31] Adkins WK, Taylor AE. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung[J]. J Appl Physiol 1990, 69(6): 2012-2018.

[32] DeMarco VG, Habibi J, Whaley-Connell AT, et al. Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2) 27 rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008, 294(6): H2659-2668.

[33]. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, et al. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Hypertension. 2009, 54(3): 668-675.

[34]. Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006, 290(6): L1069-1077.

[[35] Demarco VG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Demarco%20VG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21160609) [Whaley-Connell AT,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Whaley-Connell%20AT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21160609) [Sowers JR,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sowers%20JR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21160609) et al. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension[J]. [World J Cardiol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160609) 2010, 2(10): 316-324.

[36] DeBerardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolismNewanglesonanoldidea[J]. GenetMed. 2008, 10(11): 767-777.

[37] Vander Heiden MG, LC Cantley CB Thompson. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. Science. 2009, 324(5930): 1029-1033.

[38] Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria[J]. Cell Cycle. 2005, 4(5): 654-658.

[39] Rai PR, Cool CD, King JAC, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2008, 178(6): 558–564.

[40] Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years[J]. Diabetes Metab Rev. 1998, 14(4): 263–283.

[41] Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. Nature. 2009, 458(7239): 762–765.

[[42] Sutendra G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sutendra%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20702857) [Bonnet S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bonnet%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20702857) [Rochefort G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rochefort%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20702857) et al. Fatty Acid Oxidation and Malonyl-CoA Decarboxylase in the Vascular remodeling of pulmonary hypertension[J]. Sci Transl Med. 2010, 2(44): 44ra58.

# 第二部分 阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠**NMR**

**代谢组学的变化**

## 一、 前言

他汀类药物总称为HMG-COA还原酶抑制剂，在临床上被广泛应用于治疗血胆固醇升高的患者，包括阿托伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、美伐他汀等。我们小组前期研究发现阿托伐他汀可以明显地降低MCT诱导PAH大鼠肺动脉压力，并且可以逆转肺动脉高压时的血管重塑[1]，并且在压力未改变时，就已经出现肺血管的重塑[2]，但其机制未被很好阐明。临床上肺动脉高压确诊通过右心导管测量肺动脉压力，而发现肺动脉压力升高时，患者病情已发展至晚期，如果能早期诊断，早期应用价廉有效的药物，将对患者预后起到积极作用。因此对肺动脉高压进行早期诊断、寻找新的诊断方法意义重大。

前列环素(PGI)类药物、磷酸二酯酶-5抑制剂以及内皮素受体拮抗剂（波生坦）的出现对改善PAH患者的症状及延缓其病变的进展起到了积极的作用。一项研究表明靶向药物的使用使PAH的住院率及病死率分别下降61％和34％[3]，但是由于费用高等原因采取的单一用药，效果仍然欠佳。近年来大量的临床和基础研究显示他汀类药物具有多效性，表现在抗炎、改善内皮功能、抗氧化、抗增殖、诱导凋亡、减轻肺血管重塑、抗凝、抑制ET一1和AnglI、TXA等一系列的作用，其机制主要是对甲羟戊酸(MVA)途径中中间产物的合成起到间接的抑制作用。我们课题组的前期研究已表明，氟伐他汀可以抑制心肌纤维化和血管平滑肌细胞的增殖[4-5]；并可以改善自发性高血压大鼠阻力血管的功能及逆转阻力血管结构的重塑[6-7]。其他研究已表明氟伐他汀可改善老年高血压患者的内皮依赖性血管舒张功能[8]。Toshihiko等研究表明辛伐他汀降低MCT诱导PAH大鼠肺动脉压力，并且改善肺血管重塑[9]。在Corpataux等[10-11]的研究中，最大药物浓度应用阿托伐他汀等六种他汀类药物，在抑制新内膜形成、平滑肌细胞增殖、迁移

作用方面，它们之间进行比较差异无统计学意义。

本部分研究在成功构建PAH大鼠模型的基础上，观察阿托伐他汀治疗后不同时点肺动脉高压大鼠肺动脉重塑的变化，并通过NMR方法检测阿托伐他汀治疗

后大鼠血清代谢组学的变化，并以此为后续机制研究做基础。

## 二、 实验材料与方法

### **1** 实验材料

#### 1.1 实验动物

本实验所用Sprague-Dawley大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，许可证号：SCXK（沪）2003-0003。饲养在本院动物房，恒温（22±2℃）、恒湿

（55％±5％）、人工光照明暗各12小时。

#### 1.2 实验材料与仪器

阿托伐他汀购于美国辉瑞制药公司，余同论文第一部分。

### **2** 实验方法

#### 2.1 动物实验分组设计

雄性清洁级Sprague－Dawley大鼠120只，体重200～230g，随机分为三组：对照组、肺动脉高压组和阿托伐他汀灌胃组。首先将MCT溶于适量0.1N盐酸中，然后以0.1N氢氧化钠调节，使pH至7.2，最后用生理盐水配置成最终浓度为2％的溶液。PAH组给予一次性腹腔注射MCT 60mg/Kg，对照组给予1ml生理盐水腹腔注射。阿托伐他汀灌胃组是一次性腹腔注射MCT60mg/kg后，即予以阿托伐他汀5mg/Kg灌胃，后每天继续同剂量给予阿托伐他汀灌胃，直至大鼠被处死。

#### 2.2 其余实验方法同论文第一部分

## 三、 结 果

**1肺动脉平均压、右心室肥厚指数、WT%、WA%的变化**

### 1 天、7天时PAH组与Ctr组相比以及Ato组与PAH组相比，MPAP、RVHI、WT%、

WA%均无统计学意义（P> 0.05）。

2周时PAH组与Ctr组相比以及Ato组与PAH组相比，MPAP及RVHI并无明显升高（P> 0.05）。2周时PAH组肺小动脉管壁厚度占管径的百分比（WT％）和管壁面积占血管总面积的百分比（WA％）均明显高于Ctr组（P<0.05），而经阿托伐他汀治疗后，WT％和WA％均较PAH组明显降低（P<0.05）（图1）。

3周时PAH组与Ctr组相比以及Ato组与PAH组相比，MPAP及RVHI有明显升

，而Ato组与PAH组相比，MPAP及RVHI有明显下降（P<0.05）。4周时肺动脉高压组肺小动脉管壁厚度占管径的百分比（WT％）和管壁面积占血管总面积的百分比（WA％）均明显高于对照组（P<0.05），而经阿托伐他汀治疗后，WT％和

高

WA％均较PAH组明显降低（P<0.05）。以上结果揭示了肺动脉重塑先于肺动脉压力升高出现，并且阿托伐他汀组可以改善肺动脉重塑及降低肺动脉压力。

45 50

40 45

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

35 40

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

30 35

25 30

1d后

7d后

20 25

15 20

15

10 10

5 5

0 0

A B

70 80 \*

\*

#

\*

#

60 70 #

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

50 60 \*

40 50 \* #

14d

21d后

30 40 \* #

30

20 #

20

10 10

0 0

C D

90

\*

#

\* \*

# #

\*

#

80

肺动脉压

右室肥厚指数WT%

WA%

70

60

50

28d后

40

30

20

10

0

E

**Fig9: 不同组MPAP、RVHI、WT%、WA%的变化**

图注：\*P<0.05, PAH组同Ctr组比较；#P<0.05, Ato组同PAH组比较；MPAP：肺动脉平均压；RVHI：右心室肥厚指数；WT%：肺小动脉管壁厚度占管径的百分比；WA%：肺小动脉管壁面积占血管总面积的百分比。A：表示1d后；B：表示7d后；C：表示14天后；D：表示21天后；E：表示28天后。

### **2** 阿托伐他汀治疗后**PAH**大鼠代谢组学的变化

#### 2.1 阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠模型的血清代谢模式变化轨迹

从图10中可以看出，大鼠血清的代谢模式是可以区分的，可以分成5个部分，分别是control组、day1组、week1组、week2-3组和week4组。



**Fig 10阿托伐他汀治疗后PAH大鼠不同时点血清PCA得分图**

图注：Con指代Ctr组；Day 1＿MCT＆AT指代Ato治疗1d组（Ato day 1组）；Week 1＿MCT＆AT指代Ato治疗1w组（Ato week 1组）；Week 2＿MCT＆AT指代Ato治疗2w组（Ato week 2组）；Week 3＿MCT＆AT指代Ato治疗3w组（Ato week 3组）；Week 4＿MCT＆AT指代Ato治疗4w组（Ato week 4组）；

#### 2.2 阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠代谢模型的区分

##### 2.2.1对Ctr组和PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗1d后组（Ato day1组）进行偏最小二乘判别分析（PLS-DA）



从图11（左）中可以得出，control组和day1组是可以区分的。并且通过响应排序验证（图11右），证明PLS-DA模型可靠。

**Fig 11 control组和Ato day1组偏最小二乘判别分析得分图（左）；响应排序验证图（右）**

##### 2.2.2对control组和Ato week1组进行PLS-DA



从图12（左）中可以得出，control组和Ato week1组是可以区分的。并且通过响应排序验证（图12右），证明PLS-DA模型可靠。

**Fig 12 control组和Ato week 1偏最小二乘判别分析得分图（左）；响应排序验证图（右）**

##### 2.2.3对Ato week1组和Ato week2\_3组进行PLS-DA

从图13（左）中可以得出，Ato week1组和Ato week2\_3组是可以区分的。并且通过响应排序验证（图13右），证明PLS-DA模型可靠。



**Fig 13 Ato week 1组和Ato week2\_3组偏最小二乘判别分析得分图（左）；响应排序验证图（右）**

##### 2.2.4对Ato week2\_3组和Ato week4组进行PLS-DA

从图14（左）中可以得出，Ato week2\_3组和Ato week4组是可以区分的。并且通过响应排序验证（图14右），证明PLS-DA模型可靠。



**Fig 14 Ato week 2\_3组和Ato week 4组偏最小二乘判别分析得分图（左）；响应排序验证图（右）**

#### 2.3 阿托伐他汀治疗后肺动脉高压大鼠差异性代谢物寻找

##### 2.3.1control组和Ato day1组进行正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使用正交的偏最小OPLS-DA使control和Ato day1组的血清的代谢模式在

第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图15，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=16个，所以在显著性p=0.05和p=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为0.497和0.623。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图15，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表5。



**Fig 15（左）control组和Ato day1组OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表5 Control组与Ato day 1组差异性代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Day1 vs control |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.894, 1.279 | VLDL/LDL | 0.5568 | 2.1221 | ↓ |
| 0.962 | Leu | 0.6940 | 1.3597 | ↓↓ |
| 0.995 | Ile | 0.5418 | 1.1103 | ↓ |
| 1.049 | Val | 0.5315 | 1.0731 | ↓ |
| 1.33 | Lac | 0.7610 | 4.7577 | ↑↑ |
| 1.484 | Ala | 0.6834 | 2.5755 | ↑↑ |
| 1.922 | Acetate | 0.8884 | 1.8489 | ↑↑ |
| 2.045 | Nac | 0.8014 | 2.3078 | ↑↑ |
| 2.23 | Acetone | 0.9070 | 2.3441 | ↑↑ |
| 2.38 | Pyruvate | 0.7310 | 1.1364 | ↑↑ |
| 2.45 | Carnitine | 0.6989 | 1.1343 | ↓ |
| 2.558, 2,668 | Ci | 0.9559 | 1.4972 | ↑↑ |
| 3.04 | Cr | 0.6782 | 2.3339 | ↑↑ |
| 3.21 | Choline | 0.7174 | 1.4704 | ↑↑ |
| 3.25 | Glucose | 0.8105 | 3.4725 | ↓↓ |
| 3.573 | Gly | 0.9664 | 4.6092 | ↑↑ |
| 3.67 | Glycerol | 0.8557 | 2.5184 | ↑↑ |
| 3.983 | Hip | 0.9495 | 2.0108 | ↑↑ |

##### 2.3.2control组和Ato week1组进行正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使用正交的偏最小OPLS-DA使control和Ato week1组的血清的代谢模式在

第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图16，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in

projection，VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=16个，所以在显著性P=0.05和P=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为0.497

和0.623。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图16，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表6。

**Fig 16（左）Control组与Ato week 1组OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**



表6 Control组与Ato week 1组差异性代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week1 vs control |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.995 | Ile | 0.9104 | 2.5786 | ↓↓ |
| 0.962 | Leu | 0.8279 | 1.8496 | ↓↓ |
| 1.049 | Val | 0.8404 | 2.0079 | ↓↓ |
| 1.336 | Lac | 0.5143 | 4.8674 | ↑ |
| 2.23 | Acetone | 0.7498 | 1.2493 | ↑↑ |
| 2.28 | Ace | 0.6531 | 1.0639 | ↑↑ |
| 2.38 | Pyruvate | 0.5546 | 1.0689 | ↑ |
| 2.445 | Carnitine | 0.6843 | 1.3674 | ↓↓ |
| 2.558, 2,668 | Ci | 0.8637 | 1.7012 | ↑↑ |
| 3.04 | Cr | 0.4653 | 1.9865 | ↓ |
| 3.21 | Choline | 0.8358 | 1.7212 | ↓↓ |
| 3.25 | Glucose | 0.7718 | 3.3399 | ↓↓ |
| 3.67 | Glycerol | 0.8803 | 2.1916 | ↑↑ |

##### 2.3.3Ato week 2\_3组和Ato week 1组进行正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使用正交的偏最小OPLS-DA使Ato week2\_3组和Ato week1组的血清的代谢

模式在第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图17，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=23个，所以在显著性p=0.05和p=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为

0.413和0.526。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图17，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表7。



**Fig 17（左）Ato week 2\_3组和Ato week 1组OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表7 Ato week 2\_3组和Ato week 1组代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week2\_3 vs week1 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.894, 1.279 | LDL/VLDL | 0.4897 | 3.1081 | ↑ |
| 0.983 | Ile | 0.5212 | 1.4465 | ↑↑ |
| 0.962 | Leu | 0.4431 | 1.6786 | ↑ |
| 2.23 | Acetone | 0.5387 | 1.4087 | ↑ |
| 3.25 | Glucose | 0.4604 | 4.8568 | ↓ |
| 3.67 | Glycerol | 0.4182 | 2.2569 | ↑ |

##### 2.3.4Ato week4组和Ato week2\_3组进行正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）使用正交的偏最小OPLS-DA使Ato week4组和Ato week2\_3组的血清的代谢

模式在第一预测主成分（tp1）上很好的区分（图18，左），对OPLS-DA上的第一预测主成分（tp1）上的变量计算变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）值和相关系数（correlation coefficients, r）。样品总数为n=23个，所以在显著性p=0.05和p=0.01时的相关系数r的绝对值阀值为

0.413和0.526。筛选出VIP>1和|r|值超过阀值的变量（图18，右），对这些变量进行指认，找出差异性代谢物，代谢物的详细情况见表8。



**Fig 18（左）Ato week4组和Ato week2\_3组OPLS-DA得分图；（右）相关系数及VIP载荷图**

表8 Ato week4组和Ato week2\_3组代谢物详细情况表

| Chemical shift | Metabolites | |r| | VIP | Week4 vs week2\_3 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.995 | Ile | 0.6073 | 1.4734 | ↑↑ |
| 0.962 | Leu | 0.75 | 1.3312 | ↑↑ |
| 1.04 | Val | 0.6463 | 1.1487 | ↑↑ |
| 1.48 | Ala | 0.5124 | 1.4160 | ↑↑ |
| 1.92 | Acetate | 0.7553 | 2.0562 | ↑↑ |
| 2.04 | Nac | 0.4873 | 1.4119 | ↑ |
| 2.23 | Acetone | 0.5525 | 1.3427 | ↑↑ |
| 2.28 | Pyruvate | 0.6875 | 1.2207 | ↑↑ |
| 3.04 | Cr | 0.6008 | 3.6761 | ↑↑ |
| 3.20 | Choline | 0.8041 | 1.9852 | ↑↑ |
| 3.25 | Glucose | 0.6353 | 3.0678 | ↓↓ |
| 3.67 | Glycerol | 0.6835 | 2.2646 | ↓↓ |

## 四、 讨论

阿托伐他汀、野百合碱均会对大鼠代谢形成影响，过程复杂，解释比较困难。故我们集中在2周后的代谢详细分析，而1天及1周组做简要的分析。在本课题中，我们发现Ato组大鼠注射野百合碱后1天，肉碱明显增加，提示脂肪酸β氧化增强；葡萄糖、脂质浓度下降；甘油浓度升高，与MCT组结果一致，但缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸均明显下降。1周时未发现TMAO、NAC等改变，考虑大鼠几天未出现氧化应激反应。乳酸下降提示糖有氧氧化加强。2、3周组与1周组比较，提示：脂质、甘油浓度升高，葡萄糖下降，丙酮升高，亮氨酸、异亮氨酸升高。4

周与2、3周组比较，葡萄糖、甘油下降；多种氨基酸升高；丙酮酸升高；醋酸盐升高。本课题发现Ato组只有大鼠注射野百合碱后1天时，肉碱明显增加，其他时点肉碱均未增加，结果显示：Ato组脂肪酸β氧化被明显抑制，并且第二周开始未再出现Warburg效应，提示阿托伐他汀治疗后脂肪酸β氧化被明显抑制，促进糖的有氧氧化。因此我们认为阿托伐他汀可以明显改善肺血管重塑，并且与其抑制脂肪酸β氧化和Warburg效应相关。

## 五、 结论

阿托伐他汀可以明显改善肺血管重塑，并且与其抑制脂肪酸β氧化和

Warburg效应相关。

参考文献

[1] Liangdi Xie, Peisen Lin, Hong Xie, et al. Effects of Atorvastatin and Losartan on Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Remodeling in Rats[J]. Clinical and Experimental Hypertension. 2010, 32(8): 547–554.

[2] 林培森, 谢筱露, 谢良地, 等. 大鼠肺小动脉重塑发生在肺动脉压增高之前[J]. 中华高血压杂志. 2007, 15(10): 839-843.

[3] Wedgwood S, Devol JM, Grobe A, et al. Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension[J]. Pediatr Res. 2007, 61(1): 32–36.

[4] Xie L, Lin Z, Sun M, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on the proliferation of vascular smooth muscle Cells in spontaneously hypertensive rats[J]. Chinese Journal of Pathophysiology. 2002, 18(6): 483–485.

[5] Lin Z, Xie L, Wu K, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on the myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats[J]. Natl Med J China. 2000, 80(7): 718–719.

[6] Lin Z, Xie L, Wu K, et al. Effects of fluvastatin on structure andfunctionofresistant vesselsinspontaneously hypertensive rats[J]. Acta Pharmacologica Sinica. 1999, 20(11): 855–860.

[7] Xie L, Ouyang Q, Zhao H, et al. Effect of Benazepril and Fluvastatin on L-type Calcium Channel a1C Expression in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats[J]. Chin J Hypertension. 2008, 16(9): 1100–1104.

[8] Yang Y, Wu X, Chen J, et al. Effects of fluvastatin on endothelium dependentvasodilatation function in elder hypertensives[J]. Chinese General Practice. 2003, 6(1): 32–34.

[9] Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats[J]. Am J Respir Crit Care Med. 2002, 166(10): 1403–1408.

[10] Corpataux JM, Naik J, Porter KE, et al. A comparison of six statinson the developmentof intimal hyperplasia in a human vein culture model[J]. Eur J VaseEndovase Surg. 2005, 29(2）: 177-181.

[11] Corpataux JM, Naik J, Porter KE, et a1． The efiect of six diferent sbtins on the proliferation migration, and invasion of human smooth muscle cells[J]. J Surg Res. 2005, 129(1): 52-56.

**第三部分阿托伐他汀对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠代谢模式变化的分子机制研究**

**一**、**引言**

本课题第二部分的代谢结果已经提示：在MCT诱导的肺动脉高压模型中，伴随着肺血管增殖发展过程，出现了Warburg效应。引起Warburg效应的机制较为复杂，但是在肺动脉高压模型中进一步探讨其机制，有很重要的意义。在肿瘤细胞，

Warburg效应的分子机制，已有文献报道PI3K信号通路的异常可能是其中的一

个最常见且比较重要的分子机制。已经证实PI3K/Akt信号转导通路是作为膜受体信号转导至细胞内一个重要的途径，通过下游效应分子，包括细胞周期调节蛋白、凋亡相关蛋白等，起到抑制凋亡、促进增殖的作用[1]。导致PI3K信号通路的

激活的因素有——本身PI3K复合物的突变、抑癌基因PTEN的突变、以及酪氨酸

激酶受体信号发生异常[2]。肿瘤细胞中，PI3K通路被激活，不仅会产生非常强的调节细胞生长和生存的信号，并且导致下游的代谢发生明显的改变。

在PI3K/Akt信号转导通路中，Akt激活后，还可以使GSK-3β发生磷酸化，导致GSK-3β活性发生抑制。已经证实GSK-3β在线粒体通透转运

（mitochondrial permeability transition pore, MPTP）的开放和关闭方面起到重要的调控作用，它可以通过对线粒体内Bcl-2等多种凋亡相关蛋白的释放进行调节，阻止MPTP的开放，对细胞色素C及其凋亡诱导因子释放进行抑制，导致caspase-9、caspase-3的激活最终引起细胞凋亡并维持线粒体内膜电位

。目前文献已经证实在许多类型肿瘤和血管重塑中，失活的GSK-3ß会上调细胞存活及增殖[5-6]。

[3-4]

在PI3K信号通路中，PI3K还可通过激活下游的AKT1，参与调控HK-II表达

同时刺激细胞ATP的产生，增加细胞膜上葡萄糖转运子的表达和转位，提高细胞对葡萄糖的摄入，以保证细胞应答生长信号时的能量需求而进行能量代谢[7-9]，

并且ATK1能通过磷酸化糖酵解己糖激酶（HK）、磷酸果糖激酶2（PFK2）等关键酶增强其活性，增加糖酵解速率AKT会介导HK-2活性的增加，从而拮抗tBid这样促凋亡分子的效应，进一步细胞色素c分子的释放得到抑制，拮抗肿瘤的凋亡

作用[7, 10-15]。文献已经证实Akt活化的转基因小鼠前列腺上皮内新生物中糖酵解基因（包括HK）表达增高 。抑制Akt表达和活化有利于从线粒体外膜上剥离

[16]

HK，研究证实，部分心肌保护的作用机制最终依赖于Akt的活化。

[14]

我们知道己糖激酶是肿瘤组织糖酵解途径中的限速酶，当其表达量及活性增加的情况下，许多代谢中间产物能被瘤细胞所利用，这使得缺氧的情况下肿瘤组织还能保证足够的能源供应，用于肿瘤的生长和增殖。在四种HK的同工酶中，HK-2与恶性肿瘤相关性最大。HK-2在恶性肿瘤组织中的高表达及其调控，使肿瘤组织可以持续摄取和分解葡萄糖获取能量而不受宿主营养状态的影响，即使在终末期肿瘤病人的生理机能和营养状况正逐步下降但肿瘤组织仍优先持续摄取葡萄糖。HK-2是组织中能量代谢的调节因子。HK-2与线粒体外膜的VDAC蛋白结合后，使线粒体产生的ATP可以通过VDAC通道进入细胞质内。因此HK-2是正常细胞中无氧糖酵解及线粒体氧化磷酸化之间代谢平衡调节因子。HK-II不仅有调节细胞糖代谢的生物活性，还具有拮抗细胞凋亡的功能[17-20]. HK-II通过与VDAC结合参与线粒体膜通透转换孔复合物(PTP)构建。PTP是由包括 HK-II和线粒体外膜上的

VDAC、ANT、和Bcl-2家族（如Bax、Bid）等多种蛋白分子组成的复合物。线粒体PTP维持线粒体膜通透性稳定。线粒体PTP开放可使细胞色素C等促凋亡因子释放到胞浆，激活凋亡反应发生；其关闭可抑制线粒体膜间细胞色素C等的释放和细胞凋亡[21-22]。将精力集中在具有促进细胞存活和抗凋亡等作用的重要因子上，并且采取措施调控它们，无疑将成为未来最有效的治疗方案[23]。因此，深入了解PI3K-Akt信号通路的保护机制和下游调节机制至关重要。

[代谢结果提示脂肪酸β-氧化](http://zh.wikipedia.org/wiki/%CE%92-%E6%B0%A7%E5%8C%96)也是肺血管重塑重要的机制。CPT-1（肉碱棕榈

酰转移酶-1）是脂肪酸β-氧化的限速酶。已有文献表明[24]丙二酰辅酶A脱羧酶

（MCD）基因敲除的缺氧肺动脉高压大鼠模型中，由于缺乏丙二酰辅酶A脱羧酶这一关键的代谢酶，使丙二酰辅酶A增加，进一步抑制脂肪酸与肉碱相结合，阻止脂肪酸进入线粒体中，从而抑制脂肪酸β-氧化，导致肺动脉高压发展过程被完全阻断。Motoyama K等人研究发现，激活的固醇调节元件结合蛋白（SREBPs）可以通过抑制主动脉内皮细胞的血管内皮生长因子受体2氧化磷酸化，从而减轻动脉粥样硬化损伤[25]。Motoyama K，等研究认为HMG - CoA还原酶抑制剂（他汀类药物）可以激活SREBPs，从而抑制血管内皮生长因子（VEGF）在血管平滑肌细胞的表达[25]。SREBPs是调控基因编码的酶脂类的生物合成转录因子，其有3种同工型：SREBP-la、SREBP-lc和SREBP-2，分别由SREBP-1和SREBP-2基因编码

[26]. SREBP-1c又称脂肪细胞决定和分化因子(ADD1)，SREBP-1基因编码SREBP-la和 SREBP-1c，由于使用的启动子不同，因而第一外显子不同而产生不

同位置的转录。在所有生长活跃的培养细胞中，以SREBP-1a和SREBP-2占优势，绝大多数动物组织中则以SREBP-1c和SREBP-2为主。HMG-CoA还原酶作为胆固醇合成的限速酶参与胆固醇代谢，对于维持细胞胆固醇动态平衡起着重要的作用。而且，它受着多种因素的调节，尤其是固醇调节元件对它的调节，使它在胆固醇代谢和脂肪代谢方面有着不可忽视的作用。SREBP-1c主要在肝脏和脂肪细胞中表达，通过改变自身mRNA水平来调节脂肪生成，即其转录调节作用是由SREBP-1c mRNA的数量控制的[27]。

由于MCT诱导的肺动脉高压的肺血管重塑的动态过程涉及到许多分子的信号转导通路，调节肺动脉平滑肌细胞的增殖、分化和迁移[28-29]，完全通过信息通道来进一步解释代谢模式改变是极其困难的。我们对对照组大鼠、应用MCT腹腔注射构建的PAH模型大鼠及应用阿托伐他汀灌胃联合MCT腹腔注射构建的PAH模型大鼠，采用RT-PCR方法，检测GSK-3β和SERBP-1c、己糖激酶、CPT -1的mRNA表达，对肺动脉高压大鼠发病机制做初步的解释。目的进一步明确阿托伐他汀是否是通过GSK-3β、SREBP-1c影响到能量代谢，并且是否SREBP-1c影响MCT诱导的肺动脉高压的脂肪酸[β-氧化](http://zh.wikipedia.org/wiki/%CE%92-%E6%B0%A7%E5%8C%96)。

**二、实验与方法**

**1实验动物**

雄性Sprague-Dwley(SD)大鼠，体重200-250g, SPF级，上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，许可证号：SCXK（沪）2008-0005。

**2实验试剂**

|  |  |
| --- | --- |
| CPT-1，SERBP-1c，HK-2，GSK-3β引物 | Takara，日本 |
| β-actin 内参 | Takara，日本 |
| RNAiso Plus(D9108a) | Takara，日本 |
| ExScript TM RT Reagent Kit(perfect  Real time）(DRR037A) | Takara，日本 |
| SYBR Premix Ex TaqTM II(perfect real  time）(DRR081A) | Takara，日本 |
| 氯仿 | 江苏市无锡市达明化工有限公司，中国 |
| 异丙醇 | 江苏市无锡市达明化工有限公司，中国 |
| DEPC | 北京鼎国昌盛生物技术有限公司，中国 |
| RNA-free water | 北京鼎国昌盛生物技术有限公司，中国 |
| Antibody for GSK-3β | Abcam 公司 |
| Antibody for P- GSK-3β | CST 公司 |
| Antibody for SREBP-1c | Abcam 公司 |
| Antibody for CPT1 | Abcam 公司 |
| Antibody for HKII | Abcam 公司 |
| Antibody for β-actin | Santacruz 公司 |
| 辣根酶标记ft羊抗兔 IgG | Abcam 公司 |
| 辣根酶标记ft羊抗小鼠 IgG | Abcam 公司 |
| 丙烯酰胺 | Ameresco 公司 |
| 甲叉双丙烯酰胺 | Ameresco 公司 |
| SDS | Sigma 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 甘氨酸 | Ameresco 公司 |
| Tris | Sigma 公司 |
| 蛋白 marker | Ferments 公司 |
| PDVF 膜 | Millipore 公司 |
| 脱脂奶粉 | CST 公司 |
| Western Blot chemiluminescence  Luminol reagent | 北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| X 胶片 | 柯达公司 |
| 分析纯 | 本院中心实验室 |
| 其他实验耗材 | 同文章第一部分 |

**3实验器械**

|  |  |
| --- | --- |
| 微量加液器 | Eppendorf，德国 |
| 无菌枪头 | Axygen，美国 |
| EP 管 | Axygen，美国 |
| 离心管 | Axygen，美国 |
| 荧光定量 PCR 八联管 | Bio plastics，荷兰 |
| 其他实验耗材 | 本医院中心实验室提供 |

**4仪器设备**

|  |  |
| --- | --- |
| RT-6000 酶标分析仪 | 深圳雷杜科技有限公司，中国 |
| 2720 型 PCR 扩增仪 | Applied Biosystems，美国 |
| ABI 7500-fast 荧光定量 PCR 仪 | ABI，美国 |
| TDK-2 水平摇床 | 北京鼎国昌盛生物技术有限公司，中国 |
| TGL-20M台式高速冷冻离心机 | 长沙湘仪离心机仪器有限公司，中国 |
| 2ml玻璃匀浆管 | 福州正茂玻璃仪器厂 |
| DYY-Ш-6B型稳压稳流电泳仪 | 北京市六一仪器厂 |
| DYCZ-40B型夹芯式垂直电泳槽 | 北京市六一仪器厂 |
| DYCP-40C型 半干式碳板转印仪(槽) | 北京市六一仪器厂 |
| DYCZ-40B型 转印电泳仪（槽）（中号） | 北京市六一仪器厂 |

|  |  |
| --- | --- |
| －70℃超低温冰箱 | SANYO 公司 |
| 其他实验仪器 | 同文章前第一、二部分 |

**5实验方法**

**5.1 PAH大鼠动物模型制作方法**

参照第一部分动物模型制作方法。

**5.2实验动物分组**

参照第二部分动物分组方法

**5.3荧光定量RT-PCR实验**

5.3.1引物合成

根据GSK-3β的GI号NM\_032080, HK-2的GI号NM\_012735, SERBP-1c的GI

号AF286470.2, CPT-1的GI号NM\_031559，从GenBank上获得其基因全长序列，参考相关文献设计引物。引物由Takara公司合成纯化，序列顺序如下（见表9）：

**表9** **荧光定量RT-PCR引物序列**

| Primer | Sequence(5'-3') | Product Length |
| --- | --- | --- |
| 上游 TTCTCGGTACTACAGGGCACCA | | |
| GSK-3β |  | 107bp |
| 下游 GTCCTAGCAACAATTCAGCCAACA | | |
| 上游 GACAATGGCTGCCTGGATGA | | |
| HK-2 |  | 114bp |
| 下游 TCCCAAGTACATGCCGCTGA | | |
| 上游 CCAGAGTAGCCCCTTGTCCTT | | |
| SERBP-1c |  | 217bp |
| 下游 GHATGCCCCAGCCAAACA | | |
| 上游 AGGTCGGAAGCCCATGTTGTA | | |
| CPT-1 |  | 138bp |
| 下游 GCTGTCATGCGCTGGAAGTC | | |
| 上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC | | |
| β-actin |  | 336bp |
| 下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC | | |

5.3.2大鼠肺组织总RNA提取

A、将超低温冻结肺组织称约50mg迅速转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状；

B、向研钵中加入适量的RNAiso Plus，将研磨成粉末状的样品完全覆盖，然后

室温静置，直至样品完全融化，再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状；

C、将匀浆液转移至离心管中，室温静置5min

D、4000g4℃离心5min；

E、小心吸取上清液，移入新离心管中（切勿吸取沉淀）；

F、匀浆裂解液中加入氯仿（RNAiso Plus的1/5体积量），盖紧离心管盖，用手剧烈震荡15s。待溶液充分乳化后（无分相现象），再室温静置5min；

G、14000g4℃离心15min；

H、离心机中小心取出离心管，匀浆液分为三层。吸取上清液到另一新的离心管中（勿吸取白色中间层）；

I、向上清液加入等体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，在15-30°下静置10min；

J、14000g4℃离心10min，离心后底部出现沉淀；

K、弃去上清，缓慢沿离心管壁加入75%的乙醇1ml（切勿触及沉淀），轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁，12000g4℃离心5min后小心弃去乙醇（应尽量除净）

L、室温干燥沉淀2-5min（不可离心或加热干燥），加入适量的RNase-free水溶解沉淀，必要时可用移液枪轻轻吹打沉淀，待RNA沉淀完全溶解后用比色定量仪测定RNA浓度后-80°保存。

5.3.3 RT反应

在冰上配置RT反应液（见表10），其反转录条件为第一阶段：37℃15min 1Cycle；第二阶段：85℃5s 1Cycle。将得到的RT反应液加入到下一步的Real Time PCR反应体系中，加入量不超过反应体积的1/10量。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
| 5×PrimerScript Buffer | 2ul | 1× |
| PrimerScript Enzyme Mix I | 0.5ul |  |
| Oligo dT Primer（50uM） | 0.5ul | 25pmol |
| Random 6 mers（100uM） | 0.5ul | 25pmol |
| Total Rna |  |  |
| RNase Free dH2O | Up to 10ul |  |

**表 10** RT**反应试剂配制**

注：10ul反应体系配500ngTotal RNA

5.3.4 PCR反应

2μl逆转录好的cDNA加入到20μlReal Time PCR反应体系中，反应条件为预变性95℃30s—> 95℃5s，60℃31s 40Cycle，反应体系如下（见表11）。

**表11** **PCR反应试剂配制**

| 试剂 | 使用量 |
| --- | --- |
| SYBR® Premix Ex TaqTM II（2×） | 10μl |
| PCR Forward Primer（10 μM ） | 0.8μl |
| PCR Reverse Primer（10 μM ） | 0.8μl |
| ROX Reference Dye（50×） | 0.4μl |
| cDNA | 2μl |
| RNase Free ddH2O | 6μl |

5.3.5结果分析

使用ABI 7500-fast软件收集分析数据，采用2-△△Ct分析法进行结果比较。

**5.4蛋白免疫印迹法测定各组大鼠肺组织的GSK-3β和SERBP-1c、己糖激酶、CPT -1）的蛋白表达情况**

5.4.1大鼠肺组织总蛋白的提取

取50mg肺组织加入500μl悬浮缓冲液[100umol/L Tris·Cl(PH6.8)、0.001mol/L EDTA(PH8.0)、1µg/ml胰蛋白酶肽(aprotinin)、100µg/ml PMSF，

aprotinin]匀浆，匀浆液于－80℃冰箱反复冻融2次，加入等体积2×SDS（加

200umDTT），凝胶加样缓冲液混合，摇匀，冰上静置10min。用超声处理仪处理

2～3min。将样品置于沸水中煮10min。室温下以12, 000g离心10min，将上清液移入另一EP管中，于-70℃冰箱保存待用。

5.4.2 Bradford法进行蛋白质浓度定量

分别在各个玻璃试管中加入一定浓度的BSA（5, 10，15，20，25，30，40，

60, 80, 100μl），以0.15mM NaCl溶液补足100μl，同时以100μl的0.15mM NaCl溶液作空白对照。每管加入5ml考马斯亮蓝溶液，振荡混匀，室温放置2分钟。用1cm光径的微量比色检测A595，取A595吸光度值对标准蛋白浓度作图，画出标准曲线。将抽提的蛋白质样品以1: 250稀释：即取抽提液0.1ml于25ml容量瓶中，以0.9％NaCl溶液稀释至刻度。取100μl稀释后的样品，加入同样体积的考

马斯亮蓝溶液5ml，摇匀，室温静置2分钟，以空白管调零比色，根据画出的标准曲线，推算出样品的蛋白质浓度。根据所测的样品蛋白质浓度，将蛋白质浓度调整到10μl中含蛋白质的量为25-50μg，以便SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时上样。

5.4.3 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳

10%丙烯酰胺分离胶与5％浓缩胶的浓度，组织蛋白上样量为15ul/well）加入1×SDS上样缓冲液（含溴酚蓝），上样前煮沸5～10min。用微量加样器吸取

15μl样品，缓慢加到加样孔底部，每加完一个样品需用水清洗加样器，加样完毕后将电泳槽与电泳仪相连，正极（红色）接下槽。打开电源，恒压（80V）电泳，当溴酚蓝前沿进入分离胶，约25-30min，将电压调高至120V，继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部2/3处，关闭电源。

5.4.4转膜

样品经SDS－PAGE分离后，根据蛋白marker显示的蛋白分子量，切下目标蛋白所在的相应位置的凝胶，2mA/cm2凝胶电流半干转1.5小时；取下PDVF膜，ddH2O漂洗2-3min，将其于丽春红染液染色10min，其间轻摇染液；取出

PDVF膜，用ddH2O漂洗，观察蛋白转移的效果，并用铅笔标记好目标蛋白及内参蛋白β-actin的位置。将二者分别剪下来，自来水漂洗丽春红染液。

5.4.5封闭

将PDVF膜置于含3％脱脂奶粉的TBST(2.42g/L Tris碱、8g/L氯化钠，

pH7.6）中，室温封闭30min。

5.4.6一抗孵育

用含3％脱脂奶粉的TBST稀释一抗，与PDVF膜4℃过夜，TBST漂洗PDVF

膜5 min×3，其间于摇床轻轻摇动。

5.4.7二抗孵育

用含3％脱脂奶粉的TBS-T稀释二抗（羊抗兔， 羊抗鼠，1: 5000），与PDVF膜4℃孵育12h, TBST漂洗5 min×3。

5.4.8显影

将两种显色底物A，B液等体积混合，将混合液覆盖在膜表面，用保鲜膜把PVDF

膜包好，于暗室中将PVDF膜蛋白面覆盖X光片表面，曝光，显影、定影，X

光片显影信号的强弱用Band 5.0软件分析；蛋白表达量用IOD来表示。以β-actin作为内参照并行半定量分析，比值表示其相对含量。

**6统计学方法**

应用SPSS 15.0统计软件分析，结果采用均数±标准差( *x*±S)表示，应用多样本*t*检验分析组间差异性，组内连续变量之间差异性分析用one-way analysis of variance (ANOVA)检验。检验水准a=0.05, *P*<0.05为差别有统计学意义。

**三、结果**

**1阿托伐他汀应用对MCT诱发的PAH大鼠mRNA的影响**

**1.1阿托伐他汀对PAH大鼠肺组织GSK-3βmRNA的影响**

与对照组相比，肺动脉高压组1周后的时间点肺组织GSK-3βmRNA表达明显减弱（*P*<0.01），且随时间增加表达呈递减趋势（*P*<0.01）。应用阿托伐他汀1周后的时间点，肺组织GSK-3βmRNA表达较PAH组明显升高（*P*<0.01）。（图19）

A

 B 

GSK-3β

1.2

1

GSK-3β mRNA表达

0.8

0.6

0.4

0.2

0

C

\*

#

\* \*

\*+

# # #

1d 7d 14d 21d 28d

正常组PAH组阿托伐他汀组组别

**Fig 19 PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗后肺组织GSK-3β扩增曲线、溶解曲线以及不同时点mRNA表达比较**

图注：A：肺组织GSK-3β扩增曲线、溶解曲线，B：各组间GSK-3βmRNA表达比较。对应时间点比较\*P<0.01 VS Ctr组，#P<0.01VSPAH组；+P<0.01PAH组各时间点内多组比较。

**1.2阿托伐他汀对PAH大鼠肺动脉HK-2mRNA表达的影响**

与对照组相比，肺动脉高压1周后的时间点肺组织HK-2 mRNA表达明显增加

（*P*<0.01），且随时间增加表达呈递增趋势（*P*<0.01）。阿托伐他汀应用1周后的时间点肺组织HK-2mRNA表达较PAH组明显降低（*P*<0.01）。（图20）

A B



2

各组HK-2mRNA表达

1.5

1

0.5

0

C

HK-2

正常组PAH组阿托伐他汀组组别

\*

\*

\* \*+

# #

#

# #

1d 7d 14d 21d 28d

**Fig 20 PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗后肺组织HK-2扩增曲线、溶解曲线以及不同时点mRNA表达比较**图注：A：肺组织HK-2扩增曲线、溶解曲线，B：各组间HK-2mRNA表达比较。对应时间点比较\*P<0.01 VS

Ctr 组，#P<0.01VSPAH组；+P<0.01PAH组各时间点内多组比较。

**1.3阿托伐他汀对PAH大鼠肺动脉SERBP-1c表达的影响**

与对照组相比，PAH组1周后的时间点组肺组织SERBP-1c mRNA表达明显降低（*P*<0.01），且随时间增加表达呈递减趋势（*P*<0.01）。Ato组1周后的时间点肺组织SERBP-1c mRNA表达较PAH组明显增高（*P*<0.01）。（图21）

A B



1.2

各组别SERBP-1cmRNA表达

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

C

SERBP-1c

\*

#

\*

# # #

\* \*+

1d 7d 14d 21d 28d

正常组PAH组阿托伐他汀组组别

**Fig21 PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗后肺组织SERBP-1c扩增曲线、溶解曲线以及不同时点mRNA表达比较**

图注：A: 肺组织SERBP-1c扩增曲线、溶解曲线，B: 各组间SERBP-1cmRNA表达比较。对应时间点比较\*P<0.01 VS Ctr 组，#P<0.01VSPAH组；+P<0.01 PAH组各时间点内多组比较。

**1.4对PAH大鼠肺动脉CPT -1 mRNA表达的影响**

与对照组相比，PAH组1天后的时间点肺组织CPT-1 mRNA表达明显升高

（*P*<0.01），且随时间增加表达呈递增趋势（*P*<0.01）。Ato组1天后的时间点肺组织CPT-1 mRNA表达较PAH组明显降低（*P*<0.01）（图22）

AB



1.8

1.6

各组CPT-1mRNA表达

1.4

1.2

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

C

CPT-1

\* \* \* \*+

#

# # #

\*

#

1d 7d 14d 21d 28d

正常组PAH组阿托伐他汀组组别

**Fig 22 PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗后肺组织CPT-1扩增曲线、溶解曲线以及不同时点mRNA表达比较**图注：A：肺组织CPT-1扩增曲线、溶解曲线，B：各组间CPT-1mRNA表达比较。对应时间点比较\*P<0.01 VS

Ctr组，#P<0.01 VS PAH组；+P<0.01 PAH组各时间点内多组比较。



Fig 23 PAH大鼠予以阿托伐他汀治疗后肺组织内参扩增曲线、溶解曲线图

**2阿托伐他汀治疗对MCT诱发的PAH大鼠蛋白的影响**

**2.1野百合碱诱发PAH大鼠后蛋白变化**

与对照组相比，PAH组的1天后的时间点肺组织GSK-3β及SERBP-1c蛋白表达明显减弱（*P*<0.01），而CPT-1蛋白表达明显增强（*P*<0.01）。PAH组1周后的时间点肺组织P-GSK-3β蛋白表达明显减弱（*P*<0.01），而HK-2蛋白表达明显增

强（*P*<0.01）。(图24)

A Ctr 1d 1w 2w 3w 4w



GSK-3β

β-actin

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w



P --GSK-3β

β-actin

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w



HK-2

β-actin

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w



SERBP-1c

β-actin

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w



CPT1

β-actin

B

1

GSK-3β /β -actin

0.5

0

各组GSK-3β蛋白比值

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w组别

\*

\*

\* \* \*

0.6

0.4

GSK-3β P/β - actin

0.2

0

各组GSK-3βP蛋白差异

\*

\*

\* \*

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w组别

各组HK-2蛋白比值

各组SERBP蛋白比值

0.8

HK-2/β -actin

0.6

0.4

0.2

0

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w组别

1.5

1

\*

\*

\*

\*

SERBP/β -actin

0.5

0

\*

\* \*

\*

\*

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w

各组CPT1蛋白比值

0.8

CPT1/β -actin

0.6

0.4

0.2

0

\*

\*

\*

\*

\*

Ctr 1d 1w 2w 3w 4w组别

**Fig 24 MCT诱发的PAH大鼠肺组织各蛋白表达水平的变化(n=5)**

图注：A: Western-Blot结果；B: Western-Blot半定量分析结果。Ctr: 正常对照组；1d: MCT诱导PAH1d组；1w: MCT诱导PAH1w组；2w: MCT诱导PAH2w组；3w: MCT诱导PAH3w组；4w: MCT诱导PAH4w组。\*P<0.01 VS Ctr。

**2.2阿托伐他汀对PAH大鼠肺组织GSK-3β/GSK-3βP蛋白表达的影响**

与对照组相比，PAH组肺组织GSK-3β/GSK-3βP蛋白表达明显减弱

（*P*<0.01）。Ato组GSK-3β/GSK-3βP蛋白表达水平较PAH组明显升高（*P*<0.01）。

（图25）

A Ctr MCT(1W) MCT+Ato

GSK-3β



GSK-3βP

β-actin

0.8

#

\*

GSK-3β P/β -actin

0.6

0.4

0.2

0

B

\*

#

Ctr MCT-1w MCT-Ato组别

1

0.8

GSK-3β /β -actin

0.6

0.4

0.2

0

Ctr MCT-1w MCT-Ato组别

**Fig 25阿托伐他汀对MCT诱发的PAH大鼠肺组织GSK-3β/GSK-3βP蛋白表达水平的影响(n=5)**图注：A: Western-Blot结果，B: Western-Blot半定量分析结果。GSK-3β：糖原合成酶-3β；Ctr：正常对照组；MCT：野百合碱诱导肺动脉高压组；MCT-Ato: 阿托伐他汀治疗组。\*P<0.01 VS Ctr: #P<0.01 VS

MCT。

**2.3阿托伐他汀对PAH大鼠肺动脉HK-2蛋白表达的影响**

与对照组相比，PAH组肺动脉HK-2蛋白表达明显升高（P<0.01）。Ato组HK-2蛋白表达较PAH组明显降低（P<0.01）。（图26）

A Ctr MCT(4W) MCT+Ato

HK-2



β-actin

0.7

0.6

0.5

HK-2/β -actin

0.4

0.3

0.2

0.1

0

B

\*

#

Ctr MCT4w MCT+Ato组别

**Fig 26阿托伐他汀对MCT诱发的PAH大鼠肺动脉HK-2蛋白表达水平的影响(n=5)**

图注：A: Western-Blot结果，B: Western-Blot半定量分析结果。Ctr：正常对照组；MCT：肺动脉高压组；

MCT+Ato: 阿托伐他汀治疗组。\*P<0.01 VS Ctr; #P<0.01 VS MCT。

**2.4阿托伐他汀对PAH大鼠肺动脉SERBP-1c蛋白表达的影响**

与正常组相比，PAH组肺动脉HK-2蛋白表达明显升高，SERBP-1c表达明显降低（P<0.01）。Ato组的SERBP-1c表达水平较肺动脉高压组明显增高（P<0.01）。

（图27）

A Ctr MCT(4W) MCT+Ato

SERBP-1c



β-actin

#

\*

1

SERBP/β -actin

0.8

0.6

0.4

0.2

0

B

Ctr MCT4w MCT+Ato组别

**Fig 27阿托伐他汀对MCT诱发的PAH大鼠肺动脉SERBP-1c蛋白表达水平的影响(n=5)**

图注：A: Western-Blot结果，B: Western-Blot半定量分析结果。Ctr：正常对照组；MCT：肺动脉高压组；

MCT+Ato: 阿托伐他汀治疗组。\*P<0.01 VS Ctr; #P<0.01 VS MCT。

**2.5阿托伐他汀对PAH大鼠肺动脉CPT-1蛋白表达的影响**

与对照组相比，PAH组肺组织CPT-1蛋白表达明显升高（P<0.01）。Ato组的CPT-1蛋白表达水平较肺动脉高压组明显较低（P<0.01）。（图28）

A CT MCT(2W) MCT+Ato B

CPT1



β-actin

0.7

0.6

0.5

CPT1/β -actin

0.4

0.3

0.2

0.1

0

\*

#

Ctr MCT2w MCT+Ato组别

**Fig 28阿托伐他汀对MCT诱发的PAH大鼠肺动脉CPT1蛋白表达水平的影响(n=5)**

图注：A: Western-Blot结果，B: Western-Blot半定量分析结果。Ctr：正常对照组；MCT：肺动脉高压组；

MCT+Ato:阿托伐他汀治疗组。\*P<0.01 VS Ctr; #P<0.01 VS MCT。

**四、讨论**

肿瘤在无氧糖酵解时，GSK-3β会被抑制[30]，而T细胞激活核元件会被激活活[31]。T细胞激活核元件除了调节GSK-3β外，也可以调节线粒体膜电位（△

m）。在无氧糖酵解时，激糖激酶II(HK-II)作为一个关键的糖酵解，是被上调的，并能从细胞质移位到线粒体膜外，结合并抑制电压门控性阴离子通道（线粒体转移孔一个组成部分）。线粒体转移孔可以使凋亡介质转移到细胞质中，从而启动细胞凋亡[32]。在本课题中，我们发现MCT注射组后2就周出现细胞增殖，并出现

GSK表达下降、己糖激酶表达上升，考虑GSK3β促进HK-II与VDAC的结合，从而促进增殖，抑制凋亡。HK-II与线粒体的结合需要丝/苏氨酸激酶(Akt)的参与，Akt可促进HK-II与线粒体的结合[33]。异常的GSK-3ß信号本身也和各种纤维和血管增生的疾病呈密切相关性[33-34]。因此可以说GSK-3β在细胞的生长、分化以及突变、凋亡、信号转导中都具有重要的调节作用，并且其可以通过线粒体通透性转换孔开放的减少，从而线粒体能量生成得到改善，线粒体外膜的稳定性得到保持，继而减轻细胞的凋亡、抑制细胞的肥大、促进血管的再生。

Sklepkiewicz等研究也发现GSK-3ß的被磷酸化后可通过调节蛋白磷酸化水平，从而促进野百合碱诱导的肺动脉平滑肌细胞的增殖[35]。因此我们认为在血管重塑过程中GSK-3ß可以通过己糖激酶起到重要的调节作用，为治疗肺动脉高压提出

了一种新的治疗靶点。

前面已提到临床和基础研究都显示他汀类药物作用的多效性，可以改善内皮功能、抗增殖、诱导凋亡、减轻肺血管重塑。在我们课题中也表明他汀类药物治疗可以明显减轻肺血管重塑。阿托伐他汀可以显著增加GSK-3ß的磷酸化水平

[36]. 本实验中Ato组GSK表达增强，减轻肺血管重塑，我们推测阿托伐他汀通过调节GSK-3ß而治疗肺动脉高压，是一个新的治疗靶点。

HMG-CoA还原酶受包括固醇调节元件在内的多种因素的调节，并且在胆固醇代谢以及脂肪代谢等方面有明显的作用。SREBP-1c主要是在肝脏和脂肪细胞中表达的，由于脂肪生成的转录调节是由SREBP-1c mRNA的数量控制，因此SREBP-1c可通过改变自身mRNA水平来调节脂肪的代谢[37]。SREBP-1c具有前馈上调SREBP-2的机制，还可以上调乙酰CoA合成酶和乙酰CoA羧化酶[38]。乙酰CoA合成酶和乙酰辅酶A合成酶在乙酸代谢中起到中心的作用，其中乙酰CoA合成酶的上调，会导致乙酸合成的乙酰CoA增多；而乙酰CoA羧化酶的上调又会使乙酰CoA转变为丙二酰辅酶A的增加，从而通过CPT-1,进一步抑制脂肪酸β-氧化。我们发现MCT注射组后SREBP-1c下调，CPT-1激活，而阿托伐他汀组SREBP-1c上调，CPT-1抑制，可以很好解释为什么MCT注射组后2周出现脂肪酸β-氧化增强，而阿托伐他汀组脂肪酸β-氧化减弱。Motoyama K等研究也认为HMG - CoA还原酶抑制剂（他汀类药物）可以激活SREBPs，从而抑制血管内皮生长因子（VEGF）在血管平滑肌细胞的表达[39]。



近期已经报道了他汀类药物可以抑制血管内皮生长因子生成[40]，而VEGF促进动脉粥样硬化的进展[41–44]。因此我们认为阿托伐他汀也可以通过调节SREBP-1c而进一步影响脂肪酸的β-氧化。实际上通过Kegg数据资源库可以发现小鼠SREBP-1c基因的过表达可以显著地影响400多个基因的表达。其中显著正相关基因涉及的通路包括有亮氨酸和异亮氨酸降解、糖脂代谢、脂肪酸代谢、多不饱和脂肪酸生物合成、丙酮酸代谢、糖类代谢、胆汁酸生物合成、赖氨酸降解通路。负相关基因所涉及的显著性通路包括有脂肪细胞因子信号通路等。因此在MCT诱导的肺动脉高压模型中，SREBP-1c可能也会通过多种通路对能量进行调节，但是其中调节脂肪酸的β-氧化是最重要的机制，而阿托伐他汀可以通过上调SREBP-1c表达而抑制脂肪酸的β-氧化。因此阿托伐他汀可以通过调节GSK和固醇调节元件结合蛋白mRNA极其蛋白的表达，从而影响凋亡和细胞增殖。

**五、结论**

1、MCT注射后GSK表达下降，激活己糖激酶；MCT注射后固醇调节元件结合蛋白表达下降，CPT-1激活，脂肪酸氧化增强。

2、阿托伐他汀可以抑制GSK的表达下降，从而抑制己糖激酶；阿托伐他汀可以激活固醇调节元件结合蛋白，抑制CPT-1，脂肪酸氧化减弱。

参考文献

[1] Tuder RM, Chacon M. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform, lesion in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis[J]. J Pathol. 2001, 195(3): 367-374.

[2] Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer[J]. Curr Opin Genet Dev. 2010, 20(1): 87-90.

[3] Chung H, Seo S, Moon M, Park S. Phosphatidylinositol-3-kinase /Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells[J]. J Endocrinol. 2008, 198(3): 511-521.

[4] Yin W, Signore AP, Iwai M, et al. Preconditioning suppresses inflammation in neonatal hypoxic ischemia via Akt activation[J]. Stroke. 2007, 38(3): 1017-1024.

[5] Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2005, 334(4): 1365–1373.

[6] Wang X, Xiao Y, Mou Y, et al. A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling[J]. Circ Res. 90(3): 340–347.

[7] Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells[J]. Cancer Res. 2004, 64(1): 3892-3899.

[8] Fan Y, Dickman K G, Zong WX. Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition[J]. J Biol Chem. 2010, 285(10): 7324-7333. [9] John P, Craig S, Daryl G, et al. QS285. GLUT 1 and hexokinase 2 induction by oncogenic ras requires both the phosphoinositide 3-kinase and map kinase pathways[J]. J Surg Res. 2008, 144(2): 380-385.

[10] Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, et al. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak[J]. Mol Cell. 2004, 16(5): 819-830.

[11] Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibitsBax-induced cytochrome c release and apoptosis[J]. J Biol Chem. 2002, 277(9): 7610-7618.

[12] Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, et al. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote 310 growth factor-independent survival[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(20): 7315-7328.

[13] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption[J]. Cell Metab. 2006, 3(3): 187-197. [14] Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, et al. Hexokinase mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak[J]. Mol Cell. 2004, 16(5): 819-830.

[15] Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells[J]. Cancer Res. 2004, 64(11): 3892-3899.

[16] Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways[J]. Nat Med. 2004, 10(6): 594-601.

[17] Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis[J]. Curr Med Chem. 2003, 10(16): 1535-1551.

[18] Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases: Guardians of the mitochondria[J]. Cell Cycle. 2005, 4(5): 654-658.

[19] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gate keeper of malignancy when bound to mitochondria[J]. Oncogene. 2006, 25(34): 4777-4786.

[20] Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the" Warburg Effect", i. e., elevated glycolysis in the presence of oxygen[J]. J Bioenerg Biomembr. 2007, 39(3): 211-222. [21] Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, et al. Hexokinase mitochondria interaction mediated by

[22] Verrier F, Mignotte B, Jan G, et al. Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target[J]. Ann N Y Acad Sci. 2003, 1010: 126-142. [23] MullonkalCJ, Toledo Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion[J]. J InvestSurg. 2007, 20(3): 195-203.

[24] Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, et al. Fatty Acid Oxidation and Malonyl-CoA Decarboxylase in the Vascular Remodeling of Pulmonary Hypertension[J]. Sci Transl Med. 2010, 2(44): 44ra58.

[25] Motoyama K, Fukumoto S, Koyama H et al. SREBP inhibits VEGF expression in human smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2006, 342(1): 354-360.

[26] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation Review of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor[J]. Cell. 1997, 89(3): 331-340.

[27] Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action[J]. Journal of Biological Chemistry. 2000, 275(42): 32379-32382.

[28] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Clin Invest. 2008, 118(7): 2372–2379.

[29] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007, 293(1): L1-8.

[[30] Pastorino JG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pastorino%20JG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16288047) [Hoek JB,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hoek%20JB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16288047) [Shulga N.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shulga%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16288047) Activation of glycogen synthase kinase 3b disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity[J]. Cancer Res. 2005, 65(22): 10545–10554.

[[31] Bonnet S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bonnet%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17222789) [Archer SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Archer%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17222789) [Allalunis-Turner J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Allalunis-Turner%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17222789) et al. A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth[J]. Cancer Cell. 2007, 11(1): 37–51.

[32] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens[J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, 2(1): 67–71.

[33] Chilosi M, Poletti V, Zamo A, et al. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol. 2003, 162(5): 1495–1502.

[34] Bentley JK, Deng H, Linn MJ, et al. Airway smooth muscle hyperplasia and hypertrophy correlate with glycogen synthase kinase- 3(beta) phosphorylation in a mouse model of asthma[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009, 296(2): L176–184.

[35] Sklepkiewicz P, Schermuly RT, Tian X, et al. Glycogen synthase kinase 3beta contributes to proliferation of arterial smooth muscle cells in pulmonary hypertension[J]. PLoS One. 2011, 6(4): e18883.

[36] Jin Y, Sui HJ, Dong Y, et al. Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neurons in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK-3βsignaling pathways[J]. Acta Pharmacol Sin. 2012, 33(7): 861-872.

[37] Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, et al. Overexpression of sterol regulatory

Element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver[J]. Journal of Biological Chemistry. 2003,

278(38):36652-36660.

[38] Saneyasu T, Shiragaki M, Nakanishi K, et al. Effects of short term fasting on the expression of genes involved in lipid metabolism in chicks[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2013, 15. pii: S1096-4959(13) 00032-8.

[39] Motoyama K, Fukumoto S, Koyama H, et al. SREBP inhibits VEGF expression in human smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2006, 342(1): 354-360.

[[40] Dichtl W,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dichtl%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12524225) [Dulak J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dulak%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12524225) [Frick M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Frick%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12524225) et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. [Arterioscler Thromb Vasc Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=HMG-CoA%2Breductase%2Binhibitors%2Bregulate%2Binflammatory%2Btranscription%2Bfactors%2Bin%2Bhuman%2Bendothelial%2Band%2Bvascular%2Bsmooth%2Bmuscle%2Bcells) 2003, 23(1): 58-63.

[[41] Inoue M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Inoue%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9815864) [Itoh H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Itoh%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9815864) [Ueda M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ueda%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9815864) et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis[J]. [Circulation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vascular%2Bendothelial%2Bgrowth%2Bfactor%2B(VEGF)%2Bexpression%2Bin%2Bhuman%2Bcoronary%2Batherosclerotic%2Blesions%3A%2Bpossible%2Bpathophysiological%2Bsignificance%2Bof%2BVEGF%2Bin%2Bprogression%2Bof%2Batherosclerosis) 1998, 98(20): 2108-2116.

[[42] Celletti FL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Celletti%20FL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11419898) [Hilfiker PR,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hilfiker%20PR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11419898) [Ghafouri P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ghafouri%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11419898) et al. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque[J]. [J Am Coll Cardiol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effect%2Bof%2Bhuman%2Brecombinant%2Bvascular%2Bendothelial%2Bgrowth%2Bfactor165%2Bon%2Bprogression%2Bof%2Batherosclerotic%2Bplaque) 2001, 37(8): 2126-30.

[[43] Celletti FL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Celletti%20FL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11283668) [Waugh JM,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Waugh%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11283668) [Amabile PG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Amabile%20PG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11283668) et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression[J]. [Nat Med.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283668) 2001, 7(4): 425-429.

[[44] Zhao Q,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11877364) [Egashira K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Egashira%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11877364) [Inoue S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Inoue%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11877364) et al. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis[J]. [Circulation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vascular%2Bendothelial%2Bgrowth%2Bfactor%2Bis%2Bnecessary%2Bin%2Bthe%2Bdevelopment%2Bof%2Barteriosclerosis%2Bby%2Brecruiting%2Factivating%2Bmonocytes%2Bin%2Ba%2Brat%2Bmodel%2Bof%2Blong-term%2Binhibition%2Bof%2Bnitric%2Boxide%2Bsynthesis) 2002, 105(9): 1110-1115.

# 全文总结

1、野百合碱（MCT）可以成功构建肺动脉高压模型，2周就开始出现肺血管重塑，并且肺血管重塑先于压力升高；

2、注射野百合碱后大鼠不同时点出现不同的代谢模式，出现应激状态和细胞损伤、针对损伤的代偿修复反应、脂肪酸β氧化和Warburg效应；

3、大鼠肺小动脉的重塑与2、3周出现脂肪酸β氧化和Warburg效应代谢模式改变密切相关；

4、阿托伐他汀可以明显改善肺血管重塑，并且与其抑制脂肪酸β氧化和Warburg效应相关；肉碱、β-羟丁酸、柠檬酸升高，乙酸、丙酮下降这些指标变化可以作为病情的恶化的参考指标；

5、MCT注射后GSK表达下降，激活己糖激酶；MCT注射后固醇调节元件结合蛋白表达下降，CPT-1激活，脂肪酸氧化增强；

6、阿托伐他汀可以抑制GSK的表达下降，从而抑制己糖激酶的；阿托伐他汀可以激活固醇调节元件结合蛋白，抑制CPT-1，脂肪酸氧化减弱。

致**谢**

值此论文完成之际，首先我要衷心感谢我的导师谢良地教授，能够成为谢教授的学生，是我学习和人生路上的幸运。在跟随导师学习的三年多时间里，导师渊博的知识、严谨的作风、精益求精的科学态度时时刻刻影响并感染着我，老师在实验课题的选择，实验技术的指导，文章和论文的写作以及投稿，都倾入了大量的心血和精力，同时在生活中谢老师也经常给于我关心和照顾，导师对我的指导和关心无法在此一一枚举，所有的关心都已化作深深的记忆，铭记在我心中。

衷心感谢厦门大学化学化工学院林东海教授、福建医科大学黄彩华教授、厦门大学化学化工学院顾金苹博士在实验设计、代谢结果分析方面给于我的帮助。感谢福建医科大学高血压研究所王华军、许昌生老师在实验动物方面给予的帮助。同时我感谢师弟师妹们，同他们一起走过的这段学习日子将是我人生一段美好的回忆。

感谢福建医科大学附属传染病医院领导对我学业的支持。

最后要感谢我的爱人，我的母亲，是你们的支持和鼓励才换回我今天的顺利毕业，祝愿你们健康、快乐。再次所有曾经关心和帮助我的人们，祝愿大家一生幸福平安

林太杰

2013年06 月

**代谢组学在心血管疾病中的应用**

**【摘要】**代谢组学在心血管疾病中的应用研究成为热点。本文对代谢组学的概念做了简要介绍，综述了代谢组学在心血管疾病的发病机制、早期诊断、预防和治疗方面的现状。并对其发展前景做出展望。

**【关键词】**代谢组学；心血管疾病；核磁共振

**Application of Metabonomics in Cardiovascular Diseases Abstract:** The research on the application of metabonomics in cardiovascular disease has increasingly been explored. This paper gives a brief introduction on the concept of metabolomics, reviews application of metabolomics in the pathogenesis, early diagnosis, prevention and treatment of cardiovascular disease. Prospects for future developments are outlined.

**Keywords:** Metabonomics; Cardiovascular; Disease disease; Nuclear; Magnetic resonance

**1、代谢组学**

Nicholson教授等人于1999年首次提出代谢组学的概念，其是指通过运用核磁共振、气相色谱、高效液相色谱、质谱等系统研究手段，分析病理生理学刺激和遗传修饰引起的生物体液、组织中内源性代谢产物谱的变化，从而研究整体生物学状况和基因功能调节的改变[1]。它针对的是各种代谢路径底物和产物的小分子代谢物，包括糖、脂质、氨基酸、维生素等。机体在病理条件下，代谢产物也相应地产生了某些变化。对这些代谢产物进行代谢组学的分析，能够帮助人们理解病变过程及机体内物质的代谢途径，以便更好地发现疾病的生物标记物，辅助临床诊断及给予针对性的治疗和预防。目前心血管疾病及其并发症造成突发性心脏病死亡，已成为威胁人类健康的第一大杀手，随着代谢组学的发展，其对心血管疾病的研究也越来越多。以下对代谢组学在心血管疾病中的应用做一综述。

**2、代谢组学在心血管疾病中的应用**

**2.1冠心病**

冠心病是目前世界范围内危害最大的心脏病[2]，也是中国成年人心脏病住院和死亡的第一位原因，其发病率和死亡率依然呈上升趋势[3]。目前冠脉造影是诊断冠心病的金标准，但其作为有创的检查方式，会给患者带来一定的痛苦，同时价格昂贵，而且造影也不能识别稳定性和不稳定性心绞痛，而后者是决定患者将来是否发生心肌梗死的主要因素[4]。2002年Brindle等[5]通过冠脉造影将受试者分为两组：三支冠脉病变组和正常组。应用高分辨核磁共振(nuclear magnetic resonance, NM R)检测两组受试者的血清样本，通过建立数学模型，发现对于预测三支冠脉病变灵敏度和特异性均达到92%以上。此外, Brindle等为进一步明确

NMR技术能否识别冠脉狭窄的严重程度，将另一批经造影证实的冠心病受试者按冠状动脉狭窄程度分为轻、中、重三组。运用同样的技术建立起数学模型，发现该模型能够判断出冠状动脉病变的严重程度。该实验优于传统的冠脉造影术，具有快速、廉价、安全、无侵入性及副作用少的优点。仅需几滴血液，就可利用核磁共振指纹谱和计算机模式识别技术，判断出冠心病的严重程度[6]。另外，

Kostara等[7]用NMR对已经确诊为冠心病患者全血浆的脂质进行分析，他们认为目前严重的冠心病患者都伴随有原生质脂蛋白的改变。

心肌缺血的诊断对于冠心病诊断和治疗方法的选择非常重要。通过研究急性心肌缺血时代谢产物的变化和它们的代谢途径，可能会增加诊断冠心病的新方法及新的治疗靶点。2005年Sabatine等[ 8]用液相色谱质谱联机(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析了36例患者运动负荷试验前后血液中的代谢产物的变化。试验组为其中18例经心肌灌注显像诊断为可诱导

性心肌缺血的患者，剩余18例正常者作为对照组。结果表明在运动负荷后，试

验组柠檬酸循环的23个中间代谢物中有6种发生了显著变化，其中就有柠檬酸，而对照组无改变。此试验表明柠檬酸可以用来对试验组与对照组进行区分。

Barba等[9]于2008年利用基于NMR的代谢组学方法预测疑似冠心病人是否会出现运动诱导的心肌缺血情况。此研究选取31例疑似劳力型心绞痛但无心梗

的病人，其中22例经单光子放射计算机断层显像提示有可逆心肌灌注缺损作为试验组，9例无可逆心肌灌注缺损作为对照组，两组年龄与临床症状相似。运动

负荷试验后显示84%患者可被代谢组学分析方法准确区分，能被区分的主要成分是一部分甲基、乳酸盐、葡萄糖、亚甲基脂以及长链氨基酸。这说明代谢组学分析可以预测怀疑患有冠心病的患者是否将会发生运动诱导的心肌缺血，从而做到早期预防。

**2.2高血压**

高血压是一种多基因、多因子的复杂疾病，至今病因仍不十分清楚。目前比较一致的观点是：本病是“遗传易感性与环境因素”共同作用的结果。2003 年

Brindle等[10]应用基于1HNMR的代谢组学对17例收缩压（systolic blood pressure, SBP）≥150 mm Hg、19例SBP 131～149 mmHg和28例SBP≤130 mm Hg

的患者进行血清代谢谱的研究，以探讨患者的血清代谢谱图与原发性高血压的关系，发现SBP≤130 mm Hg和SBP≥131 mmHg人群的血清代谢谱图有明显差异，进一步分析发现这种差异主要是由于它们的脂类代谢不同造成的。2008年Lu 等

[11]用代谢组学分析了SHR与正常血压小鼠的血浆代谢物，以及SHR与年龄相关的代谢变化，结果表明相对于正常血压小鼠，SHR血浆中的非饱和脂肪酸含量明显增高，并且这些代谢物的水平在10～18周的SHR血浆中亦有增高。这种相关性提示游离脂肪酸是高血压疾病的潜在生物标记物。Akira等[12]分析了年轻的

SHR和正常血压大鼠的尿液。结果实验组尿液中的很多代谢物，如柠檬酸盐、α

-酮戊二酸和苯酰氨基醋酸都低于对照组的大鼠，说明这些代谢物可以作为区分

SHR与正常血压大鼠的标记物。2010年Akira等[13-14]选用自发性高血压脑卒中大鼠(stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP)为模型，以与模型组年龄相仿的正常血压大鼠为对照组，通过分析两组大鼠的尿液代谢物，发现实验组大鼠尿液中牛磺酸、肌酸水平高于对照组，而丁二酰牛磺酸低于对照组。这表明对于丁二酰牛磺酸这种新型代谢物的生物学及病理生理的进一步研究也许会有助于原发性高血压发病机制的探索。

**2.3高脂血症**

脂质代谢紊乱是诱发心血管疾病的重要诱因之一。Zhang等[15]采用气相色谱-质谱法(gas chromatogra-phy-mass spectrometry, GC-MS)对大鼠高脂饮食

前及高脂饮食期间0、7、14、21、28d的血浆中血脂水平进行检验，利用代谢组学分析方法，分离、鉴定出41种内生代谢物，发现高脂血症的潜在生物标记物有：β-羟基丁酸、酪氨酸和肌酸酐。Zha等[16]用GC-MS分析高脂饮食喂养的仓鼠血清代谢物，结果显示模型动物从正常发展到高胆固醇血症，进一步发展为早期的动脉粥样硬化，都是具有时间依赖性的，被检测到的21种化合物可以作为动脉粥样硬化发展的生物标记物。这些数据提供了高胆固醇血症发展为动脉粥样硬化病理生理过程的新信息。

药物代谢组学可通过测定服药后药物对心血管病模型及其心脏、血浆和脂肪组织脂类代谢的影响，来解机体内源性代谢物变化，从而阐明药物作用靶点及作用过程，揭示药物的作用机制，最终更好的起到药物在心血管疾病中治疗作用[17]。

Watkins等通过研究罗格列酮对脂类代谢组的影响，发现其是通过抑制肝脏-血液脂交换，从而降低血脂浓度并最终改变心脏的磷脂代谢[18]。

日常饮食对组织代谢的影响多会反映在血浆脂质代谢中，所以利用代谢组学研究方法评价个体间不同的饮食反应，可藉此监控正常人和心血管疾病患者血浆脂质代谢情况。通过目前在建的人类各基因表现型的脂质代谢的数据库资源[18]，我们就可以从饮食的根源上预防和控制心血管疾病的发生[17]。

**2.4心力衰竭**

充血性心力衰竭可导致心肌重塑，但目前对其潜在的机制却了解甚少。De

Souza等[19]应用高通量的蛋白质组学和代谢组学分析了假手术组的充血性心力衰竭狗的左心室心肌细胞和组织，发现蛋白质构象发生广泛变化，结蛋白和细丝蛋白和结蛋白碎片提示结构出现损害。具有心脏保护作用的热休克蛋白也发生广泛改变，一些蛋白如HSP27、HSP60、HSP70等快速增加，而另一些蛋白如GRP78、α-B-crystallin、HSP90等延迟增加，苹果酸脱氢酶(DH)、α-/β-烯醇酶和丙酮酸脱氢酶（E1的α-亚基组成部分）出现早期上调，而大量的酶出现推迟下调。

Kang等[20]将15例原发性缺血性心力衰竭及20例健康者分别作为试验、对照组，分析结果显示试验组醋酸盐和丙酮水平较对照组高，并伴有甲基丙二酸的代谢紊乱。另外，心衰患者尿液中还出现1-甲基烟酰胺的降低及胞嘧啶和苯乙酰甘氨酸的升高。心衰患者脂肪酸代谢和柠檬酸循环代谢的改变提示同能量代谢存在相

关性。

**3、总结**

在心血管疾病的研究中，近年来代谢组学使用无创的方法寻找疾病的生物标记物，甚至比传统的检测方法更加敏感，提高了疾病的确诊率。代谢组学在医学领域的应用不仅可用于诊断，还可以评估疾病的临床病程、患者的预后、手术或者药物的疗效等，而了解代谢的特征模式还可以帮助人们了解疾病的病理进程，拓宽对特殊疾病的认识[21]。但该技术仍存在诸多问题，如在诊断过程中可受各种生理因素，如健康情况、年龄、饮食、昼夜节律、压力、遗传变异等制约。如何区分生理学或病理学改变所带来的代谢图谱改变仍是一个难题。但随着科研技术不断进步及广泛应用，该技术仍将日臻完善。在不久的将来，该技术很大程度上将改变医学的研究方式，革新医学诊断和治疗方式，尤其在促进心血管病的研究和诊断方面将扮演重要角色[17]。

参考文献

[1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimulivia multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica. 1999, 29(11): 1181 -1189.

[2] GazianoJM. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine[M]. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 2001, 1-18.

[3] 赵冬. 2005心脏病学实践[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2005, 3.

[4] 李晓英. 代谢组学与冠心病[J]. 中华老年多器官疾病杂志. 2007, 6（5）: 362-364.

[5] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H NMR based metabonomics[J]. Nat Med. 2002, 8(12): 1439-1444.

[6] 屈丰雪, 余振球. 代谢组学技术及其在高血压研究中的应用[J]. 中国心血管病研究. 2008, 6(6) : 463-465.

[7] Kostara CH, Papathanasion A, Cung MT, et al. Total plsma lipid analysis in patients with established coronary heart disease by H-NMR spectroscopy.75 EAS Congress, 2005, 32-26. [8] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia[J]. Circulation. 2005, 112(25): 3868-3875.

[9] Barba I, de León G, MartníE, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease[J]. Magn Reson Med. 2008, 60(1): 27-32.

[10] Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, et al. Application of chemometrics to 1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension[J]. Analyst. 2003, 128(1): 32-36.

[11] Lu Y, A J, Wang G, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension-and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats[J]. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008, 22(18): 2882-2888. [12] Akira K, Masu S, Imachi M, et al. 1H NMR-based metabonomic analysis of urine from young

Spontaneously hypertensive rats[J]. J Pharm Biomed Anal. 2008, 46(3):550-556.

[13] Akira K, Imachi M, Hashimoto T. Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomics[J]. Hypertens Res. 2005, 28(5): 425-430.

[14] Akira K, Mitome H, Imachi M, et al. LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in(1) H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats[J]. Pharm Biomed Anal. 2010, 51(5): 1091-1096.

[15] Zhang Q, Wang G, A J, et al. Metabonomic profiling of diet-induced hyperlipidaemia in a rat model[J]. Biomarkers. 2010, 15(3): 205-216.

[16] Zha W, A J, Wang G, et al. Metabonomic characterization of early atherosclerosis in hamsters with induced cholesterol[J]. Biomarkers. 2009, 14(6): 372-380.

[17] 王泳钦, 钱令嘉, 姚林. 代谢组学在心血管疾病研究中的应用[J]. 现代预防医学. 2009, 36(6）: 1172-1173.

[18] Watkins S M, German J B. Toward the imp lementation of metabolomic assessments of human health and nutrition[J]. Curr Op in Biotechnol. 2002, 13(5): 512-516.

[19] De Souza AI, Cardin S, Wait R, et al. Proteomic andmetabolomic analysis of remodelling in congestive heart failure[J]. Cell Cardiol. 2010, 49(5): 851-863.

[20] Kang SM, Park JC, Shin MJ, et al. 1H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure[J]. Clin Biochem. 2011, 44(4): 293-299.

[21] 于正, 粱繁荣. 代谢组学在心血管疾病方面的研究进展[J]. 中国医学科学院学报. 2012, 34(4): 413-417.

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| Ala | Alanine | 丙氨酸 |
| Ace | Acetoacetic acid | 乙酰乙酸 |
| ADD1 | Adipocyte determination and differentiation factor | 脂肪细胞决定和分化因子 |
| Ci | Citric acid | 柠檬酸 |
| CPT-1 | Carnitine palmitoyl transferase -1 | 肉碱棕榈酰转移酶-1 |
| Cr | Creatine | 肌酸 |
| ET-1 | Endothelin-1 | 内皮素-1 |
| FT | Fourier transform | 傅里叶变换 |
| GLY | Glycine | 甘氨酸 |
| GSK-3β | Glycogen synthetase-3β | 糖原合成酶-3β |
| HCA | Hierarchical Cluster Analysis | 簇类分析 |
| HMG-CoA | 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-coenzyme A | 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A |
| Hip | Hippuric acid | 马尿酸 |
| HK | Hexokinase | 己糖激酶 |
| Ile | Isoleucine | 异亮氨酸 |
| Lac | [lactate](http://dict.baidu.com/s?wd=lactate) | 乳酸 |
| Leu | Leucine | 亮氨酸 |
| Lys | Lysine | 赖氨酸 |
| MCD | Malonyl-coenzyme A decarboxylase | 丙二酰辅酶 A 脱羧酶 |
| MCT | Monocrotaline | 野百合碱 |
| MCTP | Monocrotalinepyrrole | 吡咯野百合碱 |
| Met | Methionine | 蛋氨酸 |
| MPAP | Mean Pulmonary Arterial Pressure | 肺动脉平均压 |
| MPTP | Mitochondrial permeablity pore | 线粒体通透转运孔 |
| MTP | Mitochondrial transition pore | 线粒体膜转换孔 |
| Nac | N – acetylcysteine | 乙酰半胱氨酸 |
| NFAT | Nuclear factor of activated T cells | 激活 T 细胞核因子 |
| NLM | Nonlinear Maping | 非线形映射 |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance | 核磁共振 |
| OPLS-DA | Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis | 正交偏最小二乘法-判别式分析 |
| PCA | Principal Component Analysis | 主 成 分 分 析 |
| PFK2 | Phosphofructokinase-2 | 磷酸果糖激酶-2 |
| PTP | Permeablity pore | 线粒体膜通透转换孔 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| VIP | Variable importance in projection | 变量计算变量权重重要性排序 |
| PAH | Pulmonary Arterial Hypertension | 肺动脉高压 |
| PASMC | Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell | 肺动脉平滑肌细胞 |
| PLS-DA | Partial Least Squares Discriminant Analysis | 偏最小二乘法-判别式分析 |
| RVHI | Right Ventricular Hypertrophy Index | 右心室肥厚指数 |
| RVSP | Right Ventricle Systolic Pressure | 右心室收缩压 |
| SREBPs | Sterol regulatory element-binding protein | 固醇调节元件结合蛋白 |
| SERBP-1c | Sterol regulatory element-binding protein-1c | 固醇调节元件结合蛋白-1c |
| Tau | Taurine | 牛磺酸 |
| TMAO | Trimetlylamine oxide | [氧化三甲胺](http://baike.baidu.com/view/1281877.htm) |
| Val | Valine | 缬氨酸 |
| VIP | Variable importance in projection | 变量权重重要性排序 |
| VDAC | Voltage-gated anion channel | 电压门控性离子通道 |
| VSMC | Vascular Smooth Muscle Cell | 血管平滑肌细胞 |
| WA | Wall Area | 血管管壁积 |
| WT | Wall Thickness | 血管壁厚度 |
| 3-HB | β- Hydroxybutyrate | β-羟丁酸 |