

# 血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系

李鑫<sup>1,2</sup>, 李大勇<sup>2</sup>, 马贤德<sup>1</sup>, 陈文娜<sup>1</sup>, 李世征<sup>2</sup>, 侯俊杰<sup>2</sup>, 张 扬<sup>2</sup>, 李润生<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 2. 辽宁中医药大学附属医院血管外科, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] 血管内皮细胞; 动脉硬化闭塞症; 循环内皮细胞; 代谢组学

[摘要] **目的** 探讨血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症(ASO)发病的关系。**方法** 采用高脂饮食饲喂及动脉内膜损伤的方法制作大鼠 ASO 模型,造模后 8 周用光镜观察动脉大体形态, Percoll 密度梯度离心法测定外周血中循环内皮细胞(CEC)数量,酶联免疫吸附双抗体夹心法检测血清内皮素 1(ET-1)和一氧化氮(NO)水平,基于气相色谱-质谱联用技术(GC/MS)的代谢组学方法分析血清中内源性代谢物的变化。**结果** 成功建立了大鼠 ASO 模型,ASO 大鼠外周血中 CEC 数量明显增多,血清 ET-1 水平均较正常对照明显升高,NO 水平较正常对照明显降低( $P < 0.01$ );与正常对照相比,ASO 大鼠血清中的糖类、氨基酸类、脂肪酸类物质的代谢水平均发生了明显的改变。**结论** 血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化介导了 ASO 的发生,保护血管内皮的功能、调节内源性代谢物的平衡应是 ASO 的重要治疗靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Relationship Between Vascular Endothelial Cell Injury, Changes of Serum Endogenous Metabolites and Pathogenesis of Arteriosclerosis Obliterans

LI Xin<sup>1,2</sup>, LI Da-Yong<sup>2</sup>, MA Xian-De<sup>1</sup>, CHEN Wen-Na<sup>1</sup>, LI Shi-Zheng<sup>2</sup>, HOU Jun-Jie<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>2</sup>, and LI Run-Sheng<sup>2</sup>

(1. Liaoning Traditional Chinese Medical University, 2. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Cell; Arteriosclerosis Obliterans; Circulating Endothelial Cell; Metabonomics

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the relationship between vascular endothelial cell injury, changes of serum endogenous metabolites and pathogenesis of arteriosclerosis obliterans (ASO). **Methods** ASO models were constructed with the method of high-fat diet plus intimal injury. At 8 weeks after operation, the arterial morphology was observed using light microscopy, the number of circulating endothelial cells (CEC) was determined using percoll density gradient centrifugation method, serum endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) levels were detected using ELISA double antibody sandwich assay, changes of endogenous metabolites in serum were analyzed with the metabonomics method-based gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) technology. **Results** Rat models of ASO were established successfully, the number of CEC in ASO rat peripheral blood increased significantly, the serum ET-1 level was significantly higher, and the level of NO was significantly less than normal control rats after operation ( $P < 0.01$ ). Compared to normal control group, metabolism of the sugars, amino acids, fatty acids in serum of ASO rats were significantly changed. **Conclusions** Vascular endothelial cell injury and changes of serum endogenous metabolites mediated ASO, protecting the vascular endothelial function and adjusting the balance of the endogenous metabolites should be important therapeutic targets of ASO.

[收稿日期] 2014-01-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81173273);辽宁省自然科学基金(201202154);辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LJQ2012083);沈阳市科学技术项目(F12-277-1-73)

[作者简介] 李鑫,博士研究生,副主任医师,研究方向为肢体缺血性疾病的发病机制及其中西结合治疗,E-mail 为 mhtjs@163.com。通讯作者李大勇,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为周围血管疾病的病机及治疗,E-mail 为 sylidy@126.com。马贤德,硕士,讲师,研究方向为分子生物学。

动脉硬化闭塞症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) 和冠心病、缺血性中风有着共同的发病机制—动脉粥样硬化,均是在脂质代谢异常、血流动力学损伤、遗传、感染、物理化学等多种损伤刺激下启动的发病过程。ASO 虽是由于动脉不同程度狭窄或闭塞引发急性慢性肢体缺血的临床事件<sup>[1,2]</sup>,但该病理过程必须通过血液来介导和促进,当血液成分和状态异常改变时,成为“易损血液”,诱发并促进了动脉粥样硬化进程<sup>[3]</sup>,决定了 ASO 的发展、预后和转归。本研究建立大鼠 ASO 模型,并基于血管内皮细胞损伤和血清内源性代谢物的变化研究“易损血液”引发 ASO 的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、试剂与仪器

6 月龄清洁级 Wistar 大鼠 40 只,体质量  $250 \pm 20$  g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(辽)2010-0001。高脂饲料组成:62.8% 基础饲料 + 20% 猪油 + 15% 胆固醇 + 2% 胆酸钠 + 0.2% 丙基硫氧嘧啶。电热恒温培养箱 (HH · B11 · 500,上海),微量移液器 (Thermo,美国),酶标仪 (Anthos2010,奥地利),荧光显微镜 (Olympus BX50),数码摄像系统 (Olympus DP70),代谢组学仪器分析平台 (GC/MS 系统,Agilent 7890A /5975C),毛细管色谱柱 (Agilent J&W Scientific HP-5ms)。ELISA 双抗体夹心法检测试剂盒购自上海越研生物技术有限公司,内皮素 1 (endothelin-1, ET-1,批号 AE90650Ra)、一氧化氮 (nitric oxide, NO,批号:201209) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。兔抗鼠抗 VIII 因子-FITC 多克隆抗体购自武汉博士德生物公司。

### 1.2 实验分组

Wistar 大鼠 40 只按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、高脂血症组、ASO 组,每组 10 只大鼠,正常对照组、假手术组大鼠给予普通颗粒饲料,高脂血症组、ASO 组大鼠给予高脂饮食饲喂。

### 1.3 ASO 动物模型制作

联合采用高脂饮食饲喂及隐动脉内膜损伤的方法制作大鼠 ASO 模型<sup>[4]</sup>。高脂饮食饲喂 1 周后于清洁动物实验室内用 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉,每只大鼠均取左后肢消毒。从腹股沟中点向后肢内侧纵行切开皮肤,游离出隐动脉,动脉夹阻断隐动脉远、近端约 1.5 ~ 2.0 cm,取胰岛素注射器 1 支,沿隐动脉长轴从远端向近端刺入血管腔,将 0.2 ~ 0.3 mL 无菌蒸馏水缓慢注入阻断血管,至血管充盈

并维持 5 min,取下针头和动脉夹,压迫止血,缝合切口。内膜损伤模型完成后仍继续每日饲喂高脂饮食,每 4 周应用维生素 D<sub>3</sub>,于右后肢肌肉注射。假手术组用同法游离隐动脉,不做进一步处理,缝合切口。

### 1.4 标本收集

造模后 8 周,由腹主动脉采血 4 ~ 5 mL,分为两份,一份于肝素钠抗凝管中待测循环内皮细胞 (circulating endothelial cells, CEC);另一份室温静置 2 h,2500 r/min 离心 5 min,分离出血清,分装后 -80℃ 保存,用于代谢组学、血脂及免疫学检测。游离出造模时内膜损伤处左隐动脉,剪下约 1 cm,于 4% 多聚甲醛溶液中固定保存。

### 1.5 普通病理学检测

隐动脉标本常规制成 4 μm 厚石蜡切片,行苏木精-伊红 (HE) 染色。

### 1.6 CEC 检测

参考文献[5]并稍作改良,取 1.5 mL 淋巴细胞分离液于离心管中,将 1 mL 肝素钠抗凝管中外周血用玻璃吸管缓慢加入淋巴细胞分离液面上部,1800 r/min 离心 15 min,弃去上层血浆层,尽量取出全部第 2 层环状乳白色淋巴细胞层,加 PBS 液混匀,1300 r/min 离心 5 min,弃上清液,取下层细胞悬液,滴于血细胞计数池中,光镜下计数 9 个大方格的 CEC 数,同一标本计数 4 次,取平均值。另取下层细胞悬液 100 μL,加入 500 μL 多聚甲醛 4℃ 固定 10 min,取 50 μL 备测细胞悬液于专用 EP 管中,加入 2 μL 抗 VIII 因子-FITC 抗体,振荡混匀,室温避光孵育 30 min,加入 PBS 液混匀,1300 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 50 μL PBS 液重悬细胞,于荧光显微镜下观察阳性细胞 (表达绿色荧光)。

### 1.7 血脂及内皮细胞功能指标检测

应用生化分析仪进行血脂测定。采用 ELISA 双抗体夹心法对各组大鼠血清 ET-1 的含量进行检测,于 450 nm 处检测各孔吸光度 (OD) 值,根据标准品浓度及相应 OD 值拟合标准曲线及方程,计算各检测孔中待测因子的浓度。采用化学法对各组大鼠血清中 NO 含量进行检测,于 540 nm 比色,根据公式计算各待测样本中 NO 含量。

### 1.8 代谢组学检测

采用气相色谱-质谱联用技术对样本进行代谢组学分析。取 -80℃ 储存的大鼠血清样本,置室温下解冻,并涡旋震荡 5 s。每组取 6 个样本,每个样本取 40 μL,加入 150 μL 冰冷甲醇氯仿 (色谱级),涡旋振荡 30 s, -20℃ 放置 20 min。取出后,冷冻离心 (4℃ 14000 g 离心 15 min),取 160 μL 上清液加入高回收

率玻璃衍生小瓶中,采用温和氮气吹干提取液。向干燥物中加入 20 g/L 盐酸甲氧胺吡啶溶液 30  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  脎化反应 90 min。取出后继续加入 30  $\mu\text{L}$  衍生试剂, 密闭并于 70 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min。取出样本, 室温放置 30 min, 进行代谢组学分析。采用正交偏最小二乘方判别分析(OPLS-DA)模型第一主成分的 VIP 值(阈值 >1), 并结合学生氏  $t$  检验的  $P$  值(阈值 0.05)来寻找差异性表达代谢物。差异性代谢物的定性方法: 搜索自建的标准物质数据库和 NIST 商业数据库。

### 1.9 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间差异性比较采用单因

素方差分析(ANOVA), 两组间差异性比较使用独立  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠的形态学变化

正常对照组、假手术组大鼠隐动脉内皮细胞、内弹力板及平滑肌细胞均排列规整, 血管腔未见狭窄。高脂血症组大鼠隐动脉管腔略狭窄, 内膜增厚。ASO 组大鼠隐动脉管腔不规则狭窄, 内膜增厚, 动脉壁内皮细胞、内弹力板及平滑肌细胞均排列紊乱(图 1)。

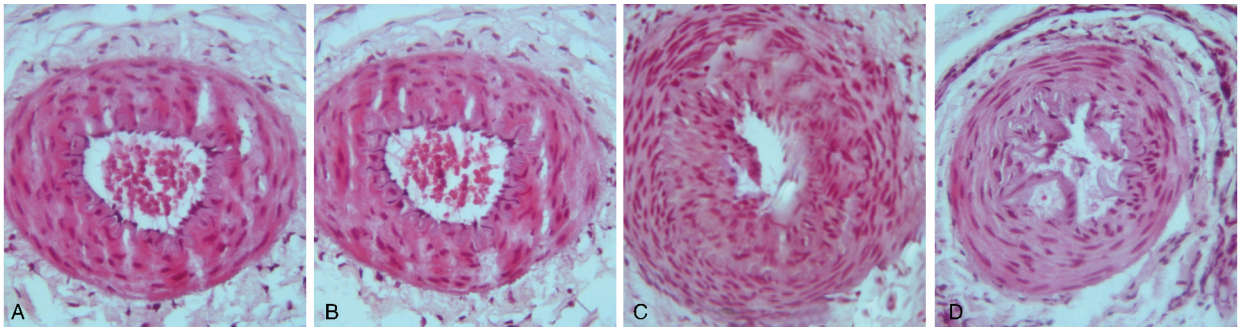


图 1. HE 染色显示隐动脉病理学变化( $\times 100$ ) A 为正常对照组, B 为假手术组, C 为高脂血症组, D 为 ASO 组。

Figure 1. Saphenous artery pathological changes by HE staining( $\times 100$ )

### 2.2 大鼠血脂水平变化

正常对照组和假手术组血脂水平无变化, 高脂血症组和 ASO 组大鼠血清总胆固醇、甘油三酯、低

密度脂蛋白水平明显升高, 高密度脂蛋白水平明显降低( $P < 0.01$ ; 表 1)。

表 1. 各组大鼠血脂水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ , mmol/L)

Table 1. Levels of blood lipids in different groups( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ , mmol/L)

| 分 组   | 甘油三酯                          | 总胆固醇                          | 低密度脂蛋白                        | 高密度脂蛋白                        |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组 | 0.55 $\pm$ 0.07               | 2.71 $\pm$ 0.24               | 1.21 $\pm$ 0.17               | 1.81 $\pm$ 0.19               |
| 假手术组  | 0.50 $\pm$ 0.06               | 2.73 $\pm$ 0.26               | 1.20 $\pm$ 0.14               | 1.81 $\pm$ 0.17               |
| 高脂血症组 | 1.70 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup> | 8.31 $\pm$ 0.70 <sup>ab</sup> | 6.87 $\pm$ 0.65 <sup>ab</sup> | 0.97 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup> |
| ASO 组 | 1.88 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup> | 9.01 $\pm$ 0.93 <sup>ab</sup> | 7.54 $\pm$ 0.69 <sup>ab</sup> | 1.03 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较。

### 2.3 大鼠 CEC 数量及 ET-1、NO 水平的变化

Ⅷ因子相关抗原免疫荧光染色发现阳性细胞超过 90%。正常对照组和假手术组大鼠外周血中 CEC 数量极少。高脂血症组大鼠外周血中 CEC 数量较正常对照组增多, ASO 组大鼠外周血中 CEC 数量增多更加明显, 与正常对照组及假手术组相比差异显著( $P < 0.01$ ; 表 2 和图 2)。与正常对照组和假手术组相比, 高脂血症组大鼠血清 ET-1 水平升高, 血清 NO 水平降低, ASO 组大鼠血清 ET-1、NO 水平的变化更为明显( $P < 0.01$ ; 表 2)。

表 2. 大鼠 ET-1、NO 水平及 CEC 数量的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2. Levels of serum ET-1, NO and CEC in different groups( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 分 组   | ET-1 (ng/L)                     | NO ( $\mu\text{mol/L}$ )       | CEC (Cells/0.9 $\mu\text{L}$ ) |
|-------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照组 | 35.24 $\pm$ 2.98                | 19.39 $\pm$ 1.51               | 0.9 $\pm$ 0.2                  |
| 假手术组  | 35.78 $\pm$ 2.73                | 18.72 $\pm$ 1.54               | 0.8 $\pm$ 0.2                  |
| 高脂血症组 | 77.05 $\pm$ 7.16 <sup>ab</sup>  | 13.26 $\pm$ 1.17 <sup>ab</sup> | 3.5 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>    |
| ASO 组 | 90.98 $\pm$ 8.73 <sup>abc</sup> | 12.72 $\pm$ 1.04 <sup>ab</sup> | 5.1 $\pm$ 1.6 <sup>abc</sup>   |

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与高脂血症组比较。

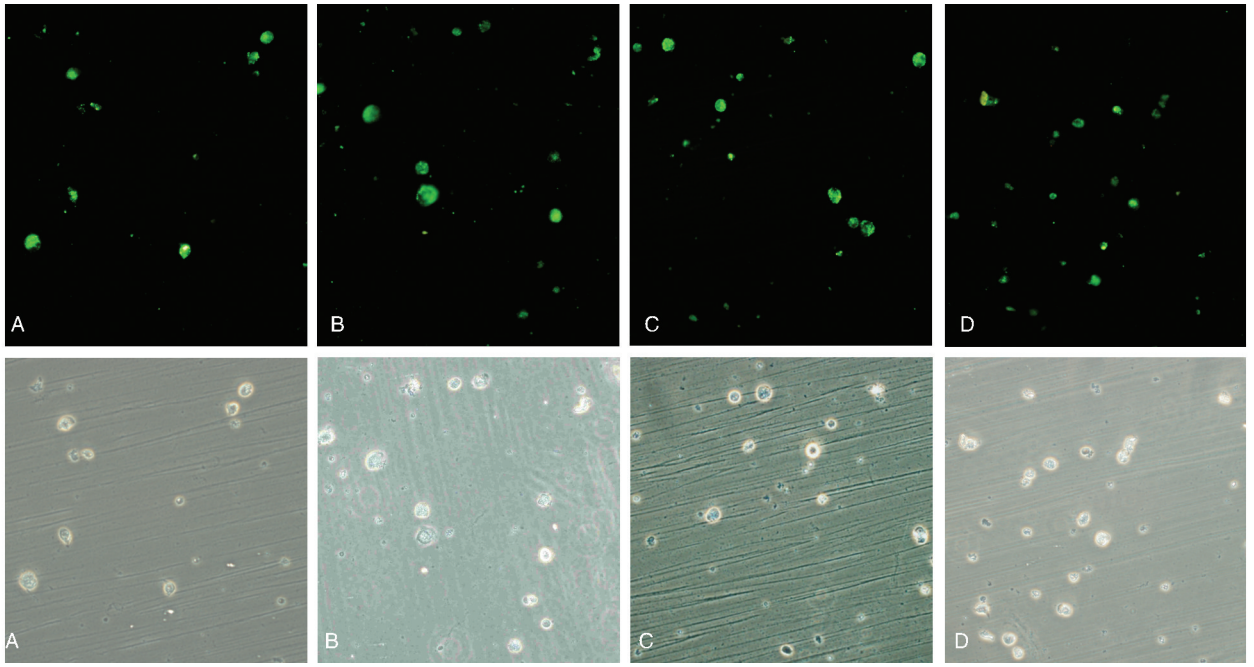


图 2. 外周血中循环内皮细胞的变化 ( $\times 400$ ) A 为正常对照组, B 为假手术组, C 为高脂血症组, D 为 ASO 组。

Figure 2. Changes of CEC in peripheral blood by fluorescent immunocytochemistry staining ( $\times 400$ )

## 2.4 大鼠代谢组学相关指标变化

首先对所有样本的总离子流色谱图(TIC)进行可视化检查,发现所有样本的仪器分析信号强、峰容量大且保留时间重现性好(图3)。为了获得各组之间显著差异的更加可靠的代谢物信息,采用 OPLS-DA 过滤与模型分类不相关信号即正交信号,获得 OPLS-DA 模型。本分析共获得 1 个主成分(P,  $R^2Y = 0.863$ )和 2 个正交成分(O,  $R^2Y = 0.24$ ,  $R^2Y = 0.0629$ ),其模型质量参数为累积  $R^2Y = 0.949$ ,  $Q^2 = 0.453$ ,  $R^2Y$  (即监督模型的解释率)大于 0.4,提示该模型可靠,说明模型可以很好地解释各组样本之间的差异(图4)。由于 OPLS-DA 过滤掉了不相关的正交信号,因而获得的差异性代谢物更加可靠。与正常对照组相比,假手术组大鼠血清代谢物质差异不大;高脂血症组大鼠血清山梨醇、月桂酸、半乳糖含量降低,胆固醇、谷甾醇、2-酮戊二酸、苹果酸、蔗糖酸、D-葡萄糖和 D-葡萄糖酸的含量明显升高;ASO 组大鼠血清糖类、氨基酸类、脂肪酸类物质的代谢水平均发生了明显的改变。各组之间的差异性代谢物数据详见表 3~5。

## 3 讨论

目前尚缺乏经典的 ASO 动物模型,但脂质代谢紊乱结合免疫损伤的方法值得重点关注<sup>[6]</sup>。大鼠具有饲养方便、抵抗力强,食性与人相近的特点,能

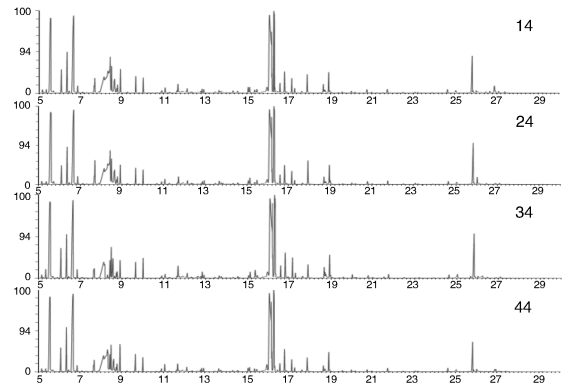


图 3. 代表性总离子流色谱图 从上至下分别为正常对照组、假手术组、高脂血症组和 ASO 组。

Figure 3. Representative total ion current chromatogram

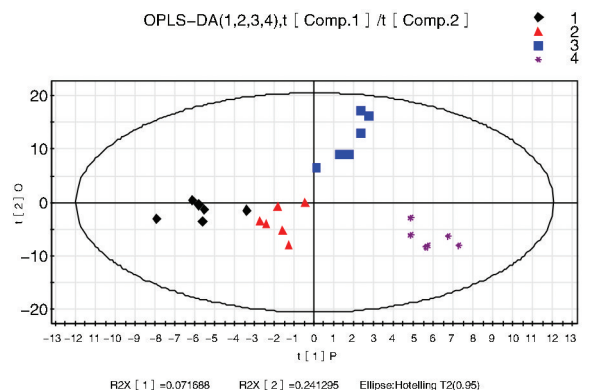


图 4. 各组 OPLS-DA 得分图 1 为正常对照组, 2 为假手术组, 3 为高脂血症组, 4 为 ASO 组。

Figure 4. OPLS-DA scores plot of different groups

表 3. 高脂血症组与正常对照组之间的差异性代谢物

Table 3. Metabolites differences between hyperlipidemia group and normal control group

| 代谢物          | VIP 值 | P 值      | Fold Change *<br>[Log <sub>2</sub> (AP/CK)] |
|--------------|-------|----------|---|
| 1,5-脱水-D-山梨醇 | 1.92  | 1.00E-02 | -0.62                                       |
| D-半乳糖        | 1.93  | 6.62E-03 | -0.23                                       |
| 月桂酸          | 1.54  | 4.46E-02 | -0.14                                       |
| D-葡萄糖        | 1.67  | 2.67E-02 | 0.14  |
| 半乳糖酸         | 1.68  | 2.53E-02 | 0.17  |
| β-谷甾醇        | 1.92  | 7.23E-03 | 0.38  |
| 丁烯二酸         | 2.16  | 1.02E-03 | 0.40  |
| L-蔗糖酸        | 1.75  | 1.98E-02 | 0.40  |
| 苹果酸          | 1.60  | 3.54E-02 | 0.43  |
| D-葡萄糖酸       | 1.72  | 2.20E-02 | 0.43  |
| 2-酮戊二酸       | 1.71  | 2.24E-02 | 0.45  |
| 胆固醇          | 1.94  | 6.27E-03 | 0.49  |
| 肌醇磷酸         | 1.94  | 6.40E-03 | 0.51  |

\* : 正号表示高脂血症组相对于正常对照组上升, 负号表示下降。

表 4. 假手术组与正常对照组之间的差异性代谢物

Table 4. Metabolites differences between sham operation group and normal control group

| 代谢物          | VIP 值 | P 值      | Fold Change *<br>[Log <sub>2</sub> (AP/CK)] |
|--------------|-------|----------|---|
| α-羟异戊酸       | 1.91  | 2.90E-02 | -0.45                                       |
| 富马酸          | 1.87  | 3.88E-02 | -0.21                                       |
| 3-α-甘露二糖     | 2.27  | 4.88E-03 | -0.18                                       |
| D-葡萄糖酸       | 2.23  | 6.14E-03 | -0.16                                       |
| 1,5-脱水-D-山梨醇 | 2.16  | 9.29E-03 | 0.41  |
| 酪氨酸          | 2.34  | 3.35E-03 | 0.66  |

\* : 正号表示假手术组相对于正常对照组上升, 负号表示下降。

表 5. ASO 组与正常对照组之间的差异性代谢物

Table 5. Metabolites differences between ASO group and normal control group

| 代谢物    | VIP 值 | P 值      | Fold Change *<br>[Log <sub>2</sub> (AP/CK)] |
|--------|-------|----------|---|
| γ-生育酚  | 1.85  | 1.54E-08 | -3.17                                       |
| 亚油酸    | 1.50  | 3.07E-03 | -0.67                                       |
| L-缬氨酸  | 1.17  | 3.15E-06 | -0.52                                       |
| L-异亮氨酸 | 1.15  | 2.99E-05 | -0.52                                       |
| 乳酸     | 1.56  | 8.84E-04 | 0.23  |
| D-半乳糖  | 1.23  | 2.55E-02 | 0.25  |
| 焦谷氨酸   | 1.33  | 1.01E-02 | 0.36  |
| L-丙氨酸  | 1.61  | 3.91E-04 | 0.39  |
| 蔗糖酸    | 1.49  | 2.72E-02 | 0.43  |
| 色氨酸    | 1.48  | 2.31E-03 | 0.43  |
| 半胱氨酸   | 1.31  | 1.23E-02 | 0.45  |
| 脱氧胆酸   | 1.31  | 2.35E-02 | 0.47  |
| 氨基丙二酸  | 1.34  | 2.18E-03 | 0.52  |
| L-脯氨酸  | 1.27  | 3.10E-02 | 0.54  |
| 苏氨酸    | 1.26  | 1.79E-02 | 0.58  |
| L-天冬氨酸 | 1.30  | 1.45E-02 | 0.67  |
| 胆固醇    | 1.51  | 4.81E-02 | 0.70  |
| 半乳糖    | 1.52  | 1.50E-03 | 0.71  |
| 山梨糖醇   | 1.35  | 1.10E-02 | 0.72  |
| 谷氨酸    | 1.51  | 1.63E-03 | 0.93  |
| α-羟丁酸  | 1.30  | 1.37E-02 | 0.97  |
| 丙酮酸    | 1.38  | 7.24E-03 | 1.00  |
| 油酸     | 1.72  | 2.85E-05 | 1.46  |
| 花生四烯酸  | 1.76  | 9.82E-06 | 1.86  |

\* : 正号表示 ASO 组相对于正常对照组上升, 负号表示下降。

够用于动脉粥样硬化的研究。本研究中给大鼠饲喂高脂饮食, 其中胆盐能明显增加大鼠对胆固醇的吸收, 丙基硫氧嘧啶能减少胆固醇的代谢, 血中总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白的含量明显升高。予维生素 D3 注射后, 血钙浓度迅速升高, 加速了动脉粥样硬化的进程, 再结合蒸馏水损伤动脉内膜, 制成的 ASO 模型较好地模拟了人 ASO 的病理变化。对于 ASO, 血管移植手术或腔内治疗是目前临床中的重要治疗手段, 但这些干预措施只能暂时解决患肢血供问题, 并不能改变血液的易损状态, 围手术期及术后长期的药物治疗则是调整血液易损状态、维持手术效果的关键。因此, 明确易损血液的实质, 进而“调节易损血液”应是临床治疗动脉粥样硬化相关疾病的主要原则和方向。

CEC 是目前在活体内唯一可以直接反映血管内皮损伤的标志物<sup>[7,8]</sup>。本研究采用密度梯度离心的方法检测发现, 高脂血症大鼠外周血中 CEC 的数量增多, ASO 造模后外周血中 CEC 的数量增多更加明显, 表明血脂代谢紊乱是动脉内皮细胞损伤的独立因素, 而内皮细胞的损伤与 ASO 的发病存在密切关系, 由于内皮细胞层的破坏, 诱发了血中脂质沉积、平滑肌细胞迁移、斑块形成等继发病理过程, 最终导致动脉腔的狭窄甚至闭塞。血管内皮损伤时, ET-1 合成和释放增加, 参与了动脉粥样硬化及多种并发症的发病过程<sup>[9,10]</sup>。NO 在生理浓度下能舒张血管, 抑制血小板的聚集和黏附, 抑制平滑肌细胞增殖, 是能阻止动脉粥样硬化病程发展的内皮保护因子<sup>[11]</sup>。本研究中免疫学检测发现, 高脂血症大鼠血清中 ET-1 的水平升高, NO 的水平明显下降, ASO 造模后的变化更为明显, 进一步证实了高脂血症可以损害动脉内皮细胞, 而内皮细胞功能受损是 ASO 早期的重要病理过程。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 能很好地描述疾病不同病理状态的代谢模式, 发现与之相关的生物标志物及代谢调控途径, 代谢产物是基因表达的最终产物, 其水平是由代谢途径中所有酶的活性及作用于这些酶的效应物决定的, 与机体的生理、病理、发育状态有关, 目前已广泛应用于医学研究的各领域<sup>[12,13]</sup>。本研究应用 GC/MS 进行血清代谢组学分析, 得到的代谢物变化有助于我们了解 ASO 的病理分子机制。研究发现, 正常对照组与假手术组大鼠的血清代谢物质差异不大。高脂血症大鼠血清总胆固醇水平明显上升, 谷甾醇作为降胆固醇的功能因子亦代偿性的轻度升高。2-酮戊二酸、苹果酸是参与三羧酸循环的内源性物质, 其变

化能反应出能量代谢的变化趋势。蔗糖酸与氧化应激反应密切相关, D-葡萄糖和 D-葡萄糖酸的血清含量亦明显升高, 这些物质量的变化均提示了血脂紊乱能刺激体内的糖类代谢、能量代谢和氧化应激水平<sup>[14,15]</sup>。

ASO 大鼠血清中的糖类、氨基酸类、脂肪酸类物质的代谢水平均发生了明显的改变。糖类代谢物中半乳糖、羟丁酸、丙酮酸、乳酸含量升高, 其中丙酮酸、乳酸是糖酵解的产物, 二者含量的升高提示 ASO 大鼠增强的能量代谢不足以供应正常的生理活动, 在能量供应不足的情况下, 机体应激性地启动了无氧酵解途径来补充生命活动所需要的 ATP。丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸含量的升高反映了线粒体功能的改变, 提示在肢体缺血条件下, 体内能量代谢的代偿性增强。缬氨酸、异亮氨酸是支链氨基酸, 在体内起着调控蛋白合成与分解的重要作用, 其含量降低与肢体缺血后蛋白代谢机能减退有关。色氨酸是生物体内的一种重要的必需氨基酸, 且色氨酸是 5-羟色胺的前体, 其含量降低可能是因为 ASO 肢体缺血状态下神经递质受到影响。半胱氨酸水平升高是动脉粥样硬化合并大血管病变的危险因素。脱氧胆酸的含量高于正常, 是长期高脂血症导致肝功能受损的结果。脯氨酸是蛋白胶原的主要成分, 而胶原作为动脉粥样硬化斑块的主要成分, 在 ASO 的发展过程中有非常重要的作用。蔗糖酸、氨基丙二酸是反映机体氧化应激状态的代谢物, ASO 发生后机体多处于氧自由基损伤组织的氧化应激状态。血清中含有多种脂肪酸, 其中油酸能够损伤血管内皮, 亚油酸可以使胆固醇酯化, 降低血中胆固醇和甘油三酯, 降低血液黏稠度, 改善血液微循环。本研究发现, ASO 大鼠血清中油酸含量升高, 亚油酸水平降低, 提示二者代谢紊乱与 ASO 的发病密切相关。动脉粥样硬化是炎症疾病的观点已经被广为接受<sup>[16,17]</sup>, 血清中花生四烯酸的浓度升高与炎症反应的发生有关, 花生四烯酸能促进包括 COX-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  在内的前炎性酶和细胞因子的表达, 是导致 ASO 发病的重要因素之一。 $\gamma$ -生育酚是维生素 E 的衍生物, 具有抗氧化、抗衰老的作用, 能增强机体的免疫力, 在 ASO 大鼠血清中其含量较低。

综上所述, 血管内皮细胞的损伤和血清内源性代谢物的变化介导了 ASO 的发生, 保护血管内皮功能、调节内源性代谢物的平衡应是 ASO 的重要治疗

靶点。

#### [参考文献]

- [1] Hamburg NM. Does endothelial dysfunction contribute to the clinical status of patients with peripheral arterial disease[J]? Can J Cardiol, 2010, 26 (Suppl A): 45A-50A.
- [2] O'Donnell DH, Moloney MA, Killeen RP, et al. Aortic plaque rupture in the setting of acute lower limb ischemia[J]. Am J Surg, 2010, 200 (4): 51-52.
- [3] 褚现明, 安毅. 易损血液与动脉粥样硬化症关系研究进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30 (5): 867-871.
- [4] 宋清斌, 车兆义, 辛世杰, 等. 动脉内注入蒸馏水并高脂喂养后大鼠的动脉内膜变化[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21 (12): 1 531-534.
- [5] 孟娟, 王质刚, 孙倩美, 等. 不同生物相容性透析膜对维持性血液透析患者血管内皮细胞的影响[J]. 中国实用内科杂志, 2008, 28 (8): 673-675.
- [6] 沈亮, 阙华发. 动脉硬化闭塞症动物模型研究现状[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14 (2): 172-174.
- [7] Eleftheriou D, Ganesan V, Hong Y, et al. Endothelial injury in childhood stroke with cerebral arteriopathy: A cross-sectional study [J]. Neurology, 2012, 79 (21): 2 089-096.
- [8] 董红梅, 黄岚, 宋耀明, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆氧化型低密度脂蛋白、高敏 C 反应蛋白与血管内皮损伤的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (3): 227-229.
- [9] Raina A, Horn ET, Benza RL. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation; a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists[J]. Transplantation, 2012, 94 (9): 885-893.
- [10] 冷爱文. 阿托伐他汀对不稳定心绞痛患者内皮素-1 和一氧化氮的影响[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31 (2): 121-123.
- [11] Madden JA. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke[J]. Neurology, 2012, 79 (13 Suppl 1): S58-62.
- [12] Hnatyshyn S, Shipkova P, Sanders M. Expedient data mining for nontargeted high-resolution LC-MS profiles of biological samples [J]. Bioanalysis, 2013, 5 (10): 1 195-210.
- [13] Xie G, Zhong W, Zheng X, et al. Chronic ethanol consumption alters mammalian gastrointestinal content metabolites[J]. J Proteome Res, 2013, 12 (7): 3 297-306.
- [14] Davies MJ. The oxidative environment and protein damage[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1703 (2): 93-109.
- [15] Dean RT, Fu S, Stocker R. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation[J]. Biochem J, 1997, 324 (Pt 1): 1-18.
- [16] 赵振国, 江渝. 动脉粥样硬化中主要炎症细胞因子的作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27 (10): 919-923.
- [17] 李俊涛, 王高频. 动脉粥样硬化炎症机制认识的新进展[J]. 临床荟萃, 2009, 24 (20): 1 838-840.

(此文编辑 文玉珊)