

基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术对去卵巢大鼠的脂质组学研究

何若晗, 陈 贇, 卢 苏

(南京中医药大学附属医院 江苏省中医院妇科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 绝经综合征; 脂质代谢物; 脂质组学

[摘要] **目的** 分析绝经大鼠脂质代谢物的变化,进而识别代谢变化中潜在的生物标志物。**方法** 将4月龄雌性SD大鼠随机分为假手术(Sham)组和去卵巢(OVX)组。采用UPLC/TQ-Orbitrap-MS的代谢组学分析方法,用主成分分析法(PCA)以及正交-偏最小二乘法分析法(OPLS-DA)进行多元统计分析,筛选与疾病有关的潜在生物标志物。**结果** 通过OPLS-DA得分图能够将假手术组和去卵巢组的大鼠血浆脂质代谢物很好地聚类区分,两组之间无明显的交叉重叠。与假手术组相比,去卵巢组中神经酰胺(Cer)、鞘磷脂(SM)、血小板活化因子(PAF)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、甘油三酯(TG)、 ω -6 不饱和脂肪酸(ω -6PUFA)的相对含量上升;甘油二酯(DG)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰甘油(PG)的相对含量下降。两组共测得35种内源性代谢产物,其中Cer、SM、PAF、LPC、TG、DG、PS、PG、 ω -6PUFA等9种为潜在的生物标志物。**结论** 筛选出的9种潜在标志物均与绝经综合征有关,为老年性退化性疾病生物标志物的早期发现奠定基础。

[中图分类号] R589.2

[文献标识码] A

Lipidomics study of ovariectomized rats based on UPLC/LTQ-Orbitrap-MS technology

HE Ruohan, CHEN Yun, LU Su

(Department of Gynaecology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Jiangsu, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] menopause syndrome; lipid metabolites; lipidomics

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the changes of lipid metabolites in menopausal rats and identify potential biomarkers in metabolic changes. **Methods** 4-month-old female SD rats were randomly divided into sham operation (Sham) group and ovariectomized (OVX) group. Using UPLC/LTQ-Orbitrap-MS metabonomics analysis method, principal component analysis (PCA) and orthogonal-partial least squares analysis (OPLS-DA) were used for multivariate statistical analysis to screen potential biomarkers related to diseases. **Results** The OPLS-DA score plot could be used to distinguish the plasma lipid metabolites of rats in the sham group and ovariectomized group, and there was no significant overlap between the two groups. Compared with the sham group, the relative contents of ceramide (Cer), sphingomyelin (SM), platelet activating factor (PAF), lysophosphatidylcholine (LPC), triglyceride (TG) and omega-6 unsaturated fatty acid (ω -6PUFA) increased in the ovariectomized group, while the relative contents of diglyceride (DG), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylserine (PS) decreased. A total of 35 endogenous metabolites were detected in both groups, including Cer, SM, PAF, LPC, TG, DG, PS, PG, ω -6PUFA as potential biomarkers. **Conclusion** All the 9 potential biomarkers were related to menopausal syndrome, which laid a foundation for the early detection of biomarkers of senile degenerative diseases.

[收稿日期] 2018-10-15

[修回日期] 2019-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81574009);江苏省自然科学基金资助项目(BK20151600);江苏省卫生计生委科研课题资助项目(Q201602)

[作者简介] 何若晗,硕士研究生,研究方向为绝经综合征的基础与临床,E-mail 为 592222057@qq.com。通信作者卢苏,主任中医师,教授,博士研究生导师,研究方向为绝经综合征的基础和临床,E-mail 为 lusu0926@sina.com。

代谢组学是针对相对分子质量 1 000 以下的内源性小分子物质进行研究^[1]。由于代谢物种类繁多且构造复杂,目前无法只用 1 种方法就将所有的代谢物全部检测清楚,因此根据代谢物的特异性进行分类研究,形成了一系列代谢组学的分支。脂质是人体内分布广泛、数量繁多的一类物质,供给机体所需的能量,不仅是人体细胞、组织的重要组成部分,更参与诸多生命活动。2003 年 Han 等^[2]正式提出脂质组学(lipidomics)的概念。脂质组学主要研究的是生命体细胞、组织、体液中的脂质种类及脂质分子^[3],最终目的是探讨生命体脂质代谢及其变化的潜在机制,用于发现疾病诊断和治疗中的生物标志物及药物靶点,提供精确和个性化的医学指导和饮食干预建议^[4]。

绝经综合征是由于女性卵巢功能衰退,垂体功能亢进,性激素水平下降而引起的一系列症状,近期症状主要表现为月经不调、血管舒缩障碍、自主神经功能失调等,远期危害主要表现为雌激素水平的下降所引起内分泌及糖、脂等各种代谢物的紊乱,这些代谢物的紊乱会引发许多老年性退化性疾病,如心血管疾病、阿兹海默症、骨质疏松症、糖尿病、肥胖症等。绝经期女性由于生殖性腺轴功能减退,雌激素分泌减少,进而机体调节脂代谢的功能下降,导致脂质代谢的紊乱,同时,其血液生物化学成分也发生明显改变。目前,采用代谢组学方法研究绝经期血浆脂代谢物变化的研究相对较少。因此,本研究采用基于液质联用技术的研究方法,以期找到与年龄相关的潜在生物标志物。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制备

4 月龄雌性 SD 大鼠 21 只,SPF 级,250~280 g,由南京中医药大学实验动物中心提供。饲养于南京中医药大学实验动物中心屏障系统内,自由进食,自由饮水,室温(23±3)℃,湿度 40%~70%。大鼠适应性喂养 1 周后开始实验。

将大鼠随机分为假手术(Sham)组和去卵巢(OVX)组。无菌条件下,OVX 组行双侧卵巢切除术,Sham 组进行假手术即只打开盆腔,不切除卵巢。术后适应性喂养 1 周,将存活的大鼠自术后第 8 天开始行阴道细胞涂片,1 次/天,连续 14 d,在光学显微镜(400×)下观察,以出现外底层细胞证明造模成功;假手术组有规律动情周期为成功。

1.2 仪器与试剂

LTQ/Orbitrap XL 质谱仪(Thermo Fisher,美国)、ACQUITY UPLC 超高效液相色谱(Waters,美国)、SPD Speed Vac 离心浓缩仪(Thermo Fisher,美国)、CO₂ 培养箱(Thermo Fisher,美国)、Allegra 64R centrifuge 型离心机(Beckman Coulter,美国)、Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(Scientific Industries,美国);CPA225D 型电子天平(Sartorius,德国),Millipore Synergy 型超纯水系统(Merck,德国),KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Revco UXF 型超低温冰箱(Thermo Fisher,美国)。HPLC 级甲醇、甲苯、乙腈、异丙醇、甲基叔丁基醚(Merck,德国),HPLC 级甲酸、甲酸铵(ROE,美国)。

1.3 样品采集及预处理

1.3.1 样本采集 连续喂养 4 周后,在禁食 24 h 后进行采血取样。先用 10% 水合氯醛按照每公斤体重 0.35 mL 对大鼠进行麻醉,麻醉生效后,固定大鼠。颈动脉取 5 mL 血液放置于一个促凝试管中,放置 1 h 后,以 3 000 r/min 速度离心 20 min,取上清液,置于-80℃低温冰箱保存备用。

1.3.2 样品前处理步骤 将血浆样本在 4℃ 下融化,取 40 μL,加入 225 μL 冰甲醇(含内标),涡旋 10 s,加入 750 μL 甲基叔丁基醚,涡旋 10 s,于 4℃ 震荡 10 min,加入 188 μL 超纯水,涡旋 20 s,于 4℃,14 000 r/min 离心 2 min,吸取 350 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管中,挥干(挥干机内放置约 2 h),转移至-20℃待测,上层挥干的样品加入 110 μL(甲醇:甲苯为 9:1),涡旋 10 min,超声 10 min,14 000 r/min 离心 10 min,上清液使用 0.22 μm 膜过滤,得到待测样本。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC HSS-T3 柱(2.1 mm×150 mm,1.8 μm),流动相 A 为含 0.1% 甲酸水,B 为含 0.1% 甲酸乙腈。梯度洗脱程序:0~1 min,2% B;1~11 min,2%~50% B;11~17 min,50%~98% B;17~18 min,98% B;18~18.5 min,98%~2% B;18.5~21 min,2%。流速 0.25 mL/min;柱温 40℃;自动进样器温度 4℃;进样量 3 μL。

1.4.2 质谱条件 LTQ Orbitrap XL 型串联质谱仪,电喷雾离子源(ESI),以正负离子电离模式采集,正离子喷雾电压为 4.80 kV,负离子喷雾电压为 4.50 kV,鞘气 40 arb,辅助气 15 arb。毛细管温度 325℃,正、负离子模式下的毛细管电压 35 V/-15 V,管透镜电压 50 V/-50 V,以分辨率 60 000 进行

全扫描,扫描范围 50 ~ 1 000 m/z ,并采用 CID 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除(重复计数为 2)去除无必要 MS/MS 信息,动态排除时间设置为 15 s。

1.5 数据处理

首先采用使用 Lipid Search 软件(Thermo 公司)对 LC-MS 检测数据进行提取和鉴定,并在 Excel2010 中对数据进行归一化处理,最后整理成二维数据矩阵形式,然后使用 Simca-p 13.0 软件进行多元统计分析,对各组样本进行区分,最后筛选出

VIP>1,统计学差异 $P<0.05$ 的化合物作为差异代谢产物,即潜在生物标记物。

2 结果

2.1 大鼠血浆总离子流图

OVX 组及 Sham 组的 UPLC-MS 总离子流图见图 1,两组总离子流色谱图基本相似,色谱峰保留时间集中在 1 ~ 24 min。

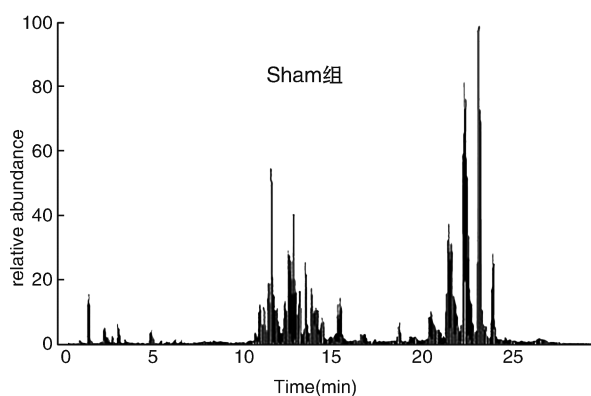
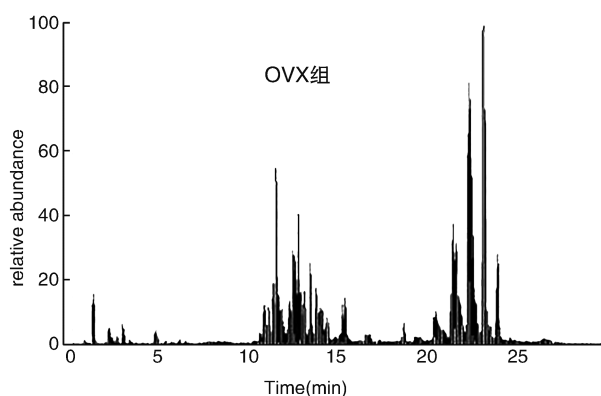


图 1. 各组大鼠血浆的 TIC 图

Figure 1. TIC of plasma of rats in each group

2.2 血浆代谢组学分析

将血浆内源性代谢物的正负离子数据,经标度化预处理数据后,导入到 SIMCA-P13.0 软件中,建立正负离子模式数据的主成分分析(PCA)模型和正交偏最小方差判别分析(OPLS-DA)模型。PCA 模型图见图 2,OPLS-DA 模型图见图 3。血浆(正离子模型): $R^2X=0.59$, $R^2Y=0.996$, $Q^2=0.789$;血浆

(负离子模型): $R^2X=0.372$, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.694$ 。模型的参数 R^2Y 表示模型的解释率, Q^2 表示模型的预测率。通过 OPLS-DA 得分图能够将假手术组和去卵巢组的大鼠血浆脂质代谢物很好地聚类区分,两组之间无明显的交叉重叠。上述参数可以看出本实验建立的模型有较高的可靠性,OVX 大鼠模型建立成功。

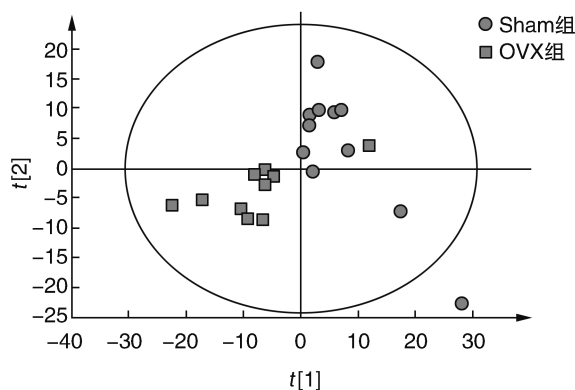
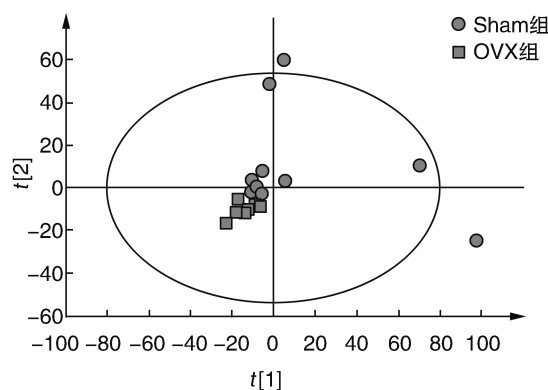


图 2. 正负离子模式下 Sham 组与 OVX 组 PCA 得分图

Figure 2. PCA scores of Sham group and OVX group under positive and negative mode

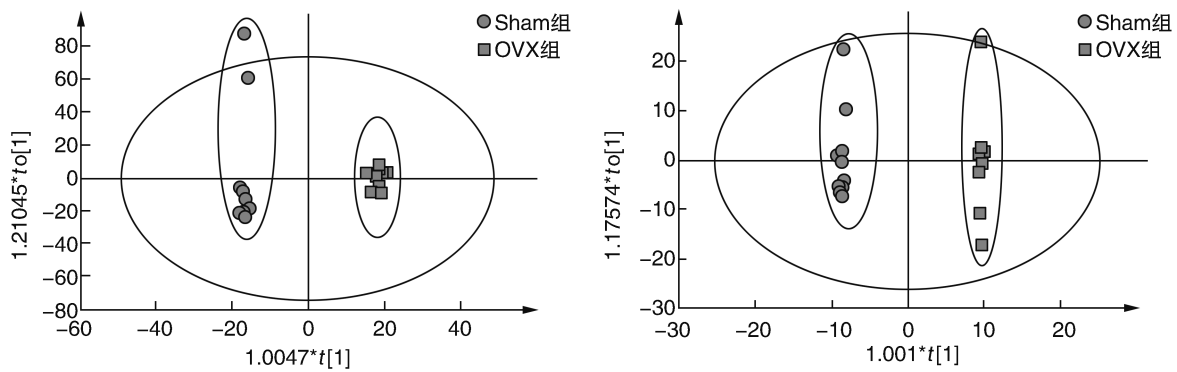


图3. 正负离子模式下 Sham 组和 OVX 组的 OPLS-DA 图

Figure 3. OPLS-DA score plot of Sham group and OVX group under positive and negative mode

2.3 潜在生物标记物的鉴定

对假手术组与去卵巢组进行 OPLS-DA 分析,将变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值>1 以及 $P<0.05$ 的脂质来评估各脂质对样本组别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异脂质。非靶向性分析并筛选出 35 种差异代谢物,作为生物标志物的候选。根据检出物的精确分子质量和质合比信息,同时结合碎片离子信息,搜索 Chemspider 数据库,完成代谢产物的鉴定,总共筛选出了 9 种潜在标志物均与绝经综合征有关。与假手术组相比,去卵巢组中神经酰胺(Cer)、鞘磷脂(SM)、血小板活化因子(PAF)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、甘油三酯(TG)、 ω -6 不饱和脂肪酸(ω -6PUFA)的相对含量上升;甘油二酯(DG)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰甘油(PG)的相对含量下降。见表 1。

2.4 代谢通路分析

将差异性代谢物输入至 KEGG 数据库,查询其代谢通路,结果显示这些代谢物主要涉及的通路包括甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、甘油酯代谢、胆固醇代谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、醚脂代谢、不饱和脂肪酸的合成等 8 种代谢途径,表明绝经期大鼠发生了以上这些代谢途径的紊乱,从而导致整个脂代谢机制的紊乱。

3 讨论

绝经是女性的一生中必经的特殊阶段,也是由成熟期迈向老年期的转折时期,伴随着性激素水平的下降,会引起整个机体代谢机制的紊乱及内源性代谢物含量的变化,尤其会引起体内脂代谢的紊乱和异常,更年期脂代谢的异常变化会诱发许多老年

性退化性疾病。本研究发现 OVX 组大鼠血浆代谢物的相对含量较 Sham 组大鼠发生显著变化,其中鞘磷脂、神经酰胺、血小板活化因子、 ω -6 多不饱和脂肪酸、溶血磷脂酰胆碱、甘油三酯的相对含量上升,甘油二酯、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油相对含量下降,这表明去卵巢大鼠体内脂代谢紊乱的状态。

鞘磷脂(sphingomyelin, SM)是血清和细胞膜上脂质的主要成分之一。研究发现,鞘磷脂和神经酰胺与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生和进展有关^[5]。As 病变中 SM 的含量高于正常动脉组织^[6]。王尹曼等^[7]研究发现,冠心病患者的 SM 水平显著升高,与对照组之间有显著差异。李剑军等^[8]研究 SM 对高密度脂蛋白 3 介导大鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇流出的影响,结果提示 SM 能促进高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇流出,并促进细胞内胆固醇酯向游离胆固醇转化。神经酰胺(ceramide, Cer)是主要分布于细胞膜的鞘脂类物质,也是第二信使分子,能激活下游大量信号分子,参与了细胞的凋亡、分化和增殖^[9]。研究证实, Cer 在糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化和栓塞性疾病等中水平是明显上调的。Cer 可阻断胰岛素信号转导的胰岛素受体底物-1/磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(IRS-1/PI3K/PKB)通路而引起胰岛素抵抗。Cer 还可抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活化,使一氧化氮(NO)产生减少,在内皮细胞中产生氧化应激,减少具有生物活性的 NO,从而发生血管内皮功能紊乱^[10]。Cer 是下丘脑中生长素释放肽和瘦素信号转导的下游介体,且 Cer 含量的增多会促进进食量和体质量的增加^[11]。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是最有效的内源性炎症介质之一,通过与一些受体结合,启动大量的细胞的促炎作用,来参与大多数慢性疾病的病理,包括心血

表 1. 去卵巢大鼠血浆代谢差异物

Table 1. Differential metabolites in plasma of ovariectomized rats

脂质代谢物	质荷比	VIP	P	Fold change	含量变化	脂质代谢物	质荷比	VIP	P	Fold change	含量变化
Cer(d18 : 1/22 : 0)	622.613	2.131	5.9916E-05	0.92987	↑ ^b	SM(d18 : 0/18 : 0)	733.621	1.624	0.00577	1.04054	↑ ^b
Cer(d20 : 1/22 : 1)	646.614	2.218	0.0001	1.86592	↑ ^b	SM(d18 : 1/18 : 0)	731.606	1.696	0.00357	0.77099	↑ ^b
Cer(d18 : 0/22 : 1)	620.598	2.115	0.00031	1.35079	↑ ^b	SM(d18 : 1/22 : 6)	775.574	2.18	3.09678E-05	1.08619	↑ ^b
Cer(d24 : 0/18 : 2+20)	678.604	2.111	0.00032	4.11816	↑ ^b	SM(d18 : 1/26 : 4)	835.668	2.097	9.05676E-05	1.03821	↑ ^b
Cer(d17 : 0/24 : 1)	634.614	2.075	0.00045	2.24305	↑ ^b	SM(d18 : 2/25 : 0)	827.700	1.833	0.00125	0.95327	↑ ^b
Cer(d24 : 0/18 : 1+20)	680.619	2.019	0.00074	3.47056	↑ ^b	SM(d20 : 1/24 : 1)	841.715	2.282	6.48963E-06	1.41882	↑ ^b
Cer(d20 : 1/16 : 0+20)	596.525	2.006	0.00082	1.44702	↑ ^b	SM(d22 : 2/14 : 0)	729.590	2.126	6.37398E-05	1.05501	↑ ^b
Cer(d17 : 1/18 : 0)	550.520	1.558	0.01505	2.02222	↑ ^a	SM(d16 : 0/25 : 1)	845.675	2.259	6.86921E-05	4.22803	↑ ^b
Cer(d17 : 0/4 : 0)	356.317	1.557	0.0151	2.5238	↑ ^a	SM(d20 : 0/18 : 1)	817.644	2.012	0.00078	1.98584	↑ ^b
Cer(d24 : 0/16 : 1+20)	652.588	1.42	0.02902	2.81353	↑ ^a	SM(d16 : 0/24 : 1)	845.675	1.784	0.00415	1.36469	↑ ^b
Cer(d16 : 0/26 : 2)	646.614	1.414	0.02977	3.6898	↑ ^a	SM(d18 : 0/15 : 1)	723.521	1.559	0.01495	2.6844	↑ ^a
Cer(d18 : 1/24 : 3)	642.583	1.351	0.03908	2.34403	↑ ^a	SM(d16 : 0/24 : 2)	843.659	1.525	0.01769	1.0701	↑ ^a
Cer(d20 : 0/16 : 1)	564.536	1.294	0.04912	1.67165	↑ ^a	SM(d18 : 1/18 : 1)	787.597	1.491	0.02086	1.5668	↑ ^a
SM(d12 : 0/22 : 1)	703.574	1.666	0.00436	0.79005	↑ ^b	SM(d16 : 1/21 : 1)	787.597	1.432	0.0274	2.21555	↑ ^a
SM(d12 : 0/22 : 2)	701.559	2.221	1.7184E-05	0.87822	↑ ^b	FA(20 : 4)	303.232	1.708	0.00662	2.09205	↑ ^b
SM(d12 : 0/23 : 1)	717.590	1.836	0.00122	1.07692	↑ ^b	FA(18 : 2)	279.232	1.416	0.02944	2.57444	↑ ^a
SM(d12 : 0/24 : 1)	731.606	1.417	0.01902	0.83934	↑ ^a	PAF(18 : 2p)	604.361	1.663	0.00856	1.89035	↑ ^b
SM(d12 : 0/24 : 2)	729.590	1.655	0.0047	1.51395	↑ ^b	TG(12 : 0p/21 : 5/24 : 2)	920.806	1.408	0.01994	1.13756	↑ ^a
SM(d12 : 0/24 : 3)	727.574	2.023	0.00021	1.02115	↑ ^b	TG(14 : 0e/16 : 0/16 : 0)	787.714	1.52	0.01088	16.429	↑ ^a
SM(d12 : 0/25 : 4)	739.574	1.361	0.02525	1.1366	↑ ^a	TG(15 : 1/14 : 1/24 : 7)	897.636	1.504	0.01189	1.09064	↑ ^a
SM(d12 : 0/26 : 2)	757.621	1.731	0.00277	1.008	↑ ^b	TG(16 : 0/20 : 5/20 : 5)	899.712	1.327	0.0297	1.20011	↑ ^a
SM(d12 : 0/26 : 4)	775.572	2.141	5.26664E-05	1.03365	↑ ^b	TG(17 : 4/12 : 0/19 : 5)	795.610	2.368	1.29114E-06	0.91421	↑ ^b
SM(d12 : 0/26 : 5)	751.574	1.71	0.00323	1.39362	↑ ^b	TG(18 : 2p/12 : 0/19 : 0)	839.688	1.644	0.00505	3.13689	↑ ^b
SM(d12 : 0/27 : 1)	773.653	2.344	2.10163E-06	1.51315	↑ ^b	TG(19 : 4/19 : 5/19 : 5)	905.665	2.48	8.76437E-08	1.54737	↑ ^b
SM(d12 : 0/28 : 1)	787.668	2.474	1.03619E-07	1.18618	↑ ^b	TG(6 : 0/22 : 1/23 : 0)	864.801	1.453	0.01575	2.55476	↑ ^a
SM(d12 : 0/30 : 1)	815.700	2.375	1.12376E-06	1.27911	↑ ^b	LPC(20 : 0)	552.402	1.333	0.02883	0.48036	↑ ^a
SM(d12 : 0/30 : 2)	813.684	2.253	1.04206E-05	0.94685	↑ ^b	LPC(22 : 1)	578.418	1.245	0.0431	0.73414	↑ ^a
SM(d12 : 0/30 : 4)	809.653	1.603	0.00659	2.53789	↑ ^b	LPC(24 : 0)	608.464	2.011	0.00023	0.81103	↑ ^b
SM(d12 : 0/30 : 5)	807.637	1.6	0.0067	1.80938	↑ ^b	LPC(24 : 1)	606.449	1.787	0.00181	0.79926	↑ ^b
SM(d12 : 0/32 : 3)	839.700	1.331	0.02918	1.1819	↑ ^a	LPC(35 : 4)	754.574	1.318	0.03097	1.199	↑ ^a
SM(d14 : 0/27 : 1)	801.684	1.285	0.03615	0.87779	↑ ^a	LPC(35 : 6)	750.543	1.483	0.01343	0.75785	↑ ^a
SM(d14 : 0/30 : 6)	833.653	1.617	0.00605	1.48634	↑ ^b	DG(12 : 0/22 : 1)	633.485	1.389	0.02193	-1.61574	↓ ^a
SM(d15 : 0/19 : 1)	703.574	1.98	0.00032	0.87003	↑ ^b	DG(14 : 0e/18 : 1)	575.500	1.326	0.02984	-2.74659	↓ ^a
SM(d16 : 0/19 : 1)	717.590	1.651	0.00484	0.81281	↑ ^b	DG(14 : 0e/20 : 3)	577.519	1.414	0.01937	-3.48142	↓ ^a
SM(d16 : 0/20 : 4)	725.559	2.169	3.62624E-05	1.37998	↑ ^b	DG(14 : 0e/22 : 5)	601.519	1.433	0.01754	-3.17967	↓ ^a
SM(d16 : 0/21 : 1)	745.621	1.514	0.01123	1.89977	↑ ^a	DG(14 : 0p/22 : 4)	601.519	1.297	0.03411	-3.09816	↓ ^a
SM(d16 : 0/21 : 2)	743.606	1.934	0.00051	2.17506	↑ ^b	DG(16 : 0e/18 : 3)	599.500	1.258	0.04077	-2.54423	↓ ^a
SM(d16 : 0/22 : 4)	753.590	1.753	0.00235	2.30872	↑ ^b	DG(17 : 0/17 : 0)	614.571	1.242	0.04361	-2.5605	↓ ^a
SM(d16 : 0/25 : 2)	799.668	2.303	4.50536E-06	1.00233	↑ ^b	DG(18 : 0p/16 : 0)	603.532	1.246	0.04294	-1.51107	↓ ^a
SM(d16 : 0/26 : 1)	815.700	2.256	1.00657E-05	1.10055	↑ ^b	DG(20 : 1p/21 : 2)	711.568	1.444	0.01655	-1.87541	↓ ^a
SM(d16 : 0/26 : 2)	813.684	2.021	0.00021	0.92847	↑ ^b	DG(20 : 3/20 : 3)	686.571	1.567	0.00824	-3.6823	↓ ^b
SM(d16 : 0/26 : 3)	811.668	2.177	3.23525E-05	2.19906	↑ ^b	DG(29 : 1/24 : 7)	853.725	1.808	0.00154	-1.44452	↓ ^b
SM(d16 : 0/27 : 1)	829.715	1.293	0.03487	3.88137	↑ ^a	DG(33 : 4/24 : 7)	919.714	1.258	0.04065	-1.07036	↓ ^a
SM(d16 : 0/27 : 2)	827.700	1.621	0.0059	1.40407	↑ ^b	DG(34 : 4/21 : 3)	883.772	1.267	0.03905	-2.59732	↓ ^a
SM(d16 : 0/27 : 3)	825.684	2.324	3.06313E-06	1.51336	↑ ^b	DG(6 : 0/22 : 4)	543.344	1.371	0.02405	-0.7895	↓ ^a
SM(d16 : 0/27 : 4)	823.668	2.311	3.94484E-06	1.08196	↑ ^b	PG(18 : 0p/15 : 0)	727.545	1.665	0.00441	-1.73754	↓ ^b
SM(d16 : 0/28 : 1)	843.731	2.384	9.22248E-07	1.63146	↑ ^b	PG(25 : 0/23 : 3)	947.728	1.564	0.00838	-2.52196	↓ ^b
SM(d16 : 0/28 : 2)	841.715	1.717	0.00306	1.07979	↑ ^b	PG(31 : 0/22 : 4)	1047.738	1.48	0.01363	-1.83978	↓ ^a
SM(d16 : 0/28 : 4)	837.684	1.523	0.01071	3.73934	↑ ^a	PG(32 : 3/16 : 1)	945.713	1.247	0.04274	-1.34892	↓ ^a
SM(d16 : 0/28 : 5)	835.668	1.591	0.00709	0.82048	↑ ^b	PS(16 : 0p/23 : 0)	856.582	1.595	0.00692	-2.67564	↓ ^b
SM(d16 : 1/16 : 0)	675.543	1.972	0.00035	1.07524	↑ ^b	PS(16 : 1p/23 : 0)	854.567	1.31	0.03223	-1.31561	↓ ^a
SM(d16 : 1/26 : 1)	813.684	1.978	0.00033	0.68854	↑ ^b	PS(24 : 4/19 : 4)	896.541	1.761	0.00221	-1.62943	↓ ^b
SM(d17 : 1/18 : 1)	715.574	1.819	0.00141	1.14567	↑ ^b	PS(32 : 4/22 : 0)	1042.802	1.309	0.0324	-2.71969	↓ ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 Sham 组比较。↑表示上升, ↓表示下降。

管疾病、中枢神经系统衰退和癌症等疾病^[12]。PAF是造成动脉粥样硬化和心力衰竭的多种机制中的一个强有力的炎性介质,可引起负性肌力作用,诱发心律失常,诱导细胞凋亡,并参与白细胞募集。不饱和脂肪酸能降低血脂,清理血栓,但过量的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)可能会损伤动脉壁,参与衰老过程。 ω -6PUFA 过多干扰人体对 ω -3PUFA 的利用,促进动物肿瘤和癌的生长。 ω -6PUFA 是环氧化酶-2(COX-2)和5-脂氧合酶(5-LOX)的特异性底物,其在细胞膜上与其反应生成的花生酸类化合物(如 PGE₂、12-羟廿碳四烯酸等)具有促癌作用,COX-2 和 5-LOX 在乳腺癌细胞中高表达,通过活化 G-蛋白耦联受体、促进肿瘤血管生成、抑制细胞凋亡和机体免疫力,增强癌细胞增殖、迁移和侵袭^[13]。溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholines, LPC)是磷脂的一种,也是氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的主要磷脂组分^[14],是特异性 G 蛋白偶联信号受体的配体,可激活多个第二信使。LPC 是导致 As 的前炎症因子,较高浓度时引起血管内皮细胞的凋亡和坏死^[15]。LPC 可促进基质金属蛋白酶-9 和白三烯 B₄ 的产生,促进斑块破裂^[16],且 LPC 具有细胞毒性,可直接损伤血管内皮细胞,破坏内皮细胞的稳态。许多研究表明,LPC 可诱导细胞膜脂质过氧化而损伤内皮细胞^[17];抑制成熟内皮细胞迁移和增殖^[18];改变内皮细胞表面黏附分子的表达分布以及多种细胞因子的分泌,促进单核细胞的迁移浸润和泡沫细胞的形成^[19]。甘油三酯(triglyceride, TG)是人体内含量最多的脂类。内源性雌激素已被公认为可降低动脉粥样硬化性心血管疾病风险,绝经期内源性雌激素下降,血糖和血脂含量也出现异常^[20]。Zhang 等^[21]敲除小鼠脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)后,发现小鼠血浆 TG 明显增高,主动脉根部出现富含泡沫细胞的 As 斑块,提示 TG 升高可以促进 As 的发生发展。

甘油二酯(diglyceride, DG)是体内脂肪代谢的中间产物,由膜脂磷脂酰肌醇(PI)衍生而来^[22]。研究表明,DG 能够降低人和小鼠血清甘油三酯^[23],在降血脂,抑制内脏脂肪和控制体质量增长方面具有重要作用。另外,DG 是细胞生命活动重要的第二信使,主要作用是激活细胞中的蛋白激酶 C^[22]。磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是酸性磷脂,也是唯一能够调控细胞膜关键蛋白的功能状态的磷脂。PS 能够营养和活化脑中各种酶的活性,可延缓神经递质的减少进程。例如去甲肾上腺素和 5-羟色胺等单胺类神经递质下降或缺少将抑制兴奋的

传递,引起抑郁症。PS 有助于改善大脑功能、修复大脑损伤。研究证实,随着年龄增长,影响大脑机能的 PS 等重要的化学物质会逐渐减少,因而记忆力和认知力下降,阿兹海默病发病率增高。Pang 等^[24]在糖尿病肾病的磷脂代谢分析中发现,糖尿病肾病组中磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油都有所下降。

综上所述,本研究基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 系统建立了去卵巢大鼠的脂质组学研究方法,分析获得与绝经期相关的 9 种潜在生物标记物,结果表明,绝经期可能发生了这些潜在生物标记物相对含量的变化及相关脂代谢途径的紊乱。这些脂代谢物的异常变化与绝经后心脑血管等代谢性疾病的发生发展密切相关。通过对绝经期生命体脂代谢变化的轮廓的认识,从而初步了解绝经期的脂代谢病理变化特点。对绝经期脂代谢变化的认识,不仅仅只反映了绝经期的机体脂代谢变化的特点,更重要的是有助于预防及延缓许多老年性退化性疾病的发生与发展,发展关于老年性疾病的相关理论研究,更有助于开发针对性强、副作用少的新药物来指导临床,伴随着世界人口老龄化,关于女性绝经前后健康管理的研究将成为世界范围内研究的热点问题。

[参考文献]

- [1] Wishart DS. Current progress in computational metabolomics [J]. Brief Bioinform, 2007, 8(5): 279-293.
- [2] Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics [J]. J Lipid Res, 2003, 44(6): 1071-1079.
- [3] Oresic M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19(11): 816-824.
- [4] Hu T, Zhang JL. Mass-spectrometry-based lipidomics [J]. J Sep Sci, 2018, 41(1): 351-372.
- [5] Alewijnse AE, Peters SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both? [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 585(2-3): 292-302.
- [6] Nilsson A, Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin [J]. J Lipid Res, 2006, 47(1): 154-171.
- [7] 王尹曼,陈学颖,徐磊,等.鞘磷脂与冠状动脉粥样硬化性心脏病患者冠状动脉狭窄程度的相关性研究[J].中国临床医学,2015,22(03): 310-313, 317.
- [8] 李剑军,陈佩芳,吴满平,等.磷脂对高密度脂蛋白3介导大鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇流出的影响[J].中国动脉硬化杂志,2000,8(2): 107-110.

- [9] Castro BM, Prieto M, Silva LC. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties[J]. *Prog Lipid Res*, 2014, 54: 53-67.
- [10] Li H, Junk P, Huwiler A, et al. Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2002, 106(17): 2250-2256.
- [11] Ramírez S, Martins L, Jacas J, et al. Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin[J]. *Diabetes*, 2013, 62(7): 2329-2337.
- [12] Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S, et al. Mediterranean diet and platelet-activating factor: a systematic review[J]. *Clin Biochem*, 2018, 60: 1-10.
- [13] 刘本君, 郭宏军, 葛佳瑞, 等. 多不饱和脂肪酸与肿瘤关系的研究进展[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2007, (5): 7-8.
- [14] Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 10-18.
- [15] Tsai TY, Leong IL, Cheng KS, et al. Lysophosphatidylcholine-induced cytotoxicity and protection by heparin in mouse brain bEND. 3 endothelial cells[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2019, 33(1): 52-62.
- [16] Domeij H, Hua X, Su J, et al. Annexin A5 inhibits atherogenic and pro-inflammatory effects of lysophosphatidylcholine[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2013, 106: 72-78.
- [17] 刘勇, 余艳荣, 彭维杰, 等. 吴茱萸次碱改善溶血性磷脂酰胆碱诱导的内皮细胞缝隙连接细胞间通讯功能障碍[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11): 1514-1519.
- [18] Rikitake Y, Kawashima S, Yamashita T, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(4): 1006-1012.
- [19] 亢爱春, 霍勇, 齐丽彤. 溶血磷脂酰胆碱在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(12): 1083-1086.
- [20] Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, et al. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism[J]. *Mol Metab*, 2018, 15: 45-55.
- [21] Zhang X, Qi R, Xian X, et al. Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet[J]. *Circ Res*, 2008, 102(2): 250-256.
- [22] 韩贻仁. 分子细胞生物学[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 2012: 257-258.
- [23] Maki KC, Davidson MH, Tsushima R, et al. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil[J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(6): 1230-1236.
- [24] Pang LQ, Liang QL, Wang YM, et al. Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 869(1-2): 118-125.

(此文编辑 朱雯霞)