

本文引用: 朱雅馨, 徐瑞霞, 张月, 等. 利拉鲁肽对糖尿病心肌病大鼠心功能及心肌代谢异常的改善作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(6): 494-502. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.06.006.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2024)32-06-0494-09

利拉鲁肽对糖尿病心肌病大鼠心功能及心肌代谢异常的改善作用

朱雅馨, 徐瑞霞, 张月, 渠惠琳, 张薇, 柳昊睿, 王芳, 郭远林, 李建军

中国医学科学院 北京协和医学院 心血管疾病国家重点实验室 国家心血管病中心 阜外医院心血管代谢中心, 北京市 100037

[摘要] **[目的]** 研究利拉鲁肽对糖尿病心肌病(DCM)大鼠心肌代谢物及相关代谢通路的影响。**[方法]** 3周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 随机抽取 10 只作为正常对照组, 其余均采用腹腔注射链脲佐菌素联合高糖高脂饮食法建立 DCM 大鼠模型。DCM 造模成功大鼠 36 只, 随机分为 DCM 模型组(DCM 组)、低剂量利拉鲁肽治疗组(LL 组)、高剂量利拉鲁肽治疗组(HL 组), 每组各 12 只。LL 组(100 $\mu\text{g/kg}$)和 HL 组(200 $\mu\text{g/kg}$)分别给予利拉鲁肽腹腔注射, 每日一次, 干预 12 周后, 经超声心动图检测心功能后麻醉处死大鼠, 并取心脏组织进行代谢组学检测, 筛选并富集与利拉鲁肽改善 DCM 大鼠心肌代谢可能有关的差异代谢物及相关通路。**[结果]** 超声结果显示, 与正常对照组相比, DCM 组左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)显著降低, 左心室舒张早期最大血流/二尖瓣心房收缩期最大血流比值(E/A)明显升高($P<0.05$)。与 DCM 组相比, LL 组和 HL 组大鼠 LVEF、LVFS 明显升高, E/A 比值显著降低($P<0.05$), 提示 LL 组和 HL 组左心室收缩和舒张功能受损明显减轻。代谢组学检测共发现 395 种代谢物, 其中 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组各自富集出组间差异代谢物分别为 239 种、116 种、187 种, 代谢通路分别为 13 条、6 条、20 条。以上三组共交集出关键差异代谢物 29 种, 主要涉及 3 条代谢通路($P<0.05$), 包括胆碱代谢通路、咖啡因代谢通路以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路, 其中胆碱代谢通路差异最为显著。**[结论]** 利拉鲁肽可明显改善 DCM 大鼠心功能及心肌代谢异常, 其中胆碱代谢通路可能在利拉鲁肽改善心肌代谢保护心脏功能过程中起到关键作用。

[关键词] 糖尿病心肌病; 利拉鲁肽; 心功能; 心肌代谢组学; 胆碱代谢通路

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of liraglutide on cardiac dysfunction and myocardial metabolism abnormality in diabetic cardiomyopathy rats

ZHU Yaxin, XU Ruixia, ZHANG Yue, QU Huilin, ZHANG Wei, LIU Haorui, WANG Fang, GUO Yuanlin, LI Jianjun
Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College & State Key Laboratory of Cardiovascular Disease & National Center for Cardiovascular Diseases & Cardiometabolic Center, Fuwai Hospital, Beijing 100037, China

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of liraglutide on myocardial metabolites and related metabolic pathways in diabetic cardiomyopathy (DCM) rats. **Methods** Among 60 SPF male SD rats aged 3 weeks, 10 rats were randomly selected as normal control group ($n=10$), and the remaining 50 rats were established by peritoneal injection of streptozotocin combined with high-sugar and high-fat diet for DCM rat model. A total of 36 rats were successfully modeled for DCM and randomly divided into DCM model group (DCM group, $n=12$), low-dose liraglutide treatment group (LL group, $n=12$) and high-dose liraglutide treatment group (HL group, $n=12$). Rats in LL group (100 $\mu\text{g/kg}$) and HL group (200 $\mu\text{g/kg}$) were given intraperitoneal injection of liraglutide once a day. And after 12 weeks of intervention, the rats were killed under anesthesia after echocardiography to detect cardiac function, and the heart tissues were taken for metabolomics detection. The differential metabolites and related pathways that may be related to liraglutide improving myocardial metabolism in DCM rats were screened and enriched. **Results** Compared with normal control group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) in DCM group were significantly decreased, and the ratio of early to late diastolic mitral flow velocities (E/A) was significantly increased ($P<0.05$). Compared with DCM

[收稿日期] 2024-01-22

[修回日期] 2024-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82172334);北京协和医学院协和青年基金(3332018200)

[作者简介] 朱雅馨, 硕士研究生, 研究方向为糖脂代谢异常, E-mail: zhuyaxin131@163.com。通信作者徐瑞霞, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化, E-mail: ruixiaxu@sina.com。

group, LVEF and LVFS in LL group and HL group were significantly increased, and E/A ratio was significantly decreased ($P < 0.05$), suggesting that the impairment of left ventricular systolic and diastolic function in LL group and HL group was significantly alleviated. 395 metabolites were detected by metabolomics, among which 239, 116 and 187 different metabolites and 13, 6 and 20 metabolic pathways were enriched in DCM group and normal control group, LL group and DCM group, HL group and DCM group. In the above three groups, 29 key differential metabolites were identified related to 3 metabolic pathways including choline metabolic pathway, caffeine metabolic pathway and valine, leucine and isoleucine biosynthesis pathway, among which choline metabolic pathway had the most significant differences. **Conclusion** These results indicated that liraglutide can ameliorate cardiac dysfunction in DCM rats through improving myocardial metabolism in which choline metabolism pathway may play a key role.

[**KEY WORDS**] diabetic cardiomyopathy; liraglutide; cardiac function; myocardial metabolomics; choline metabolic pathway

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是在排除缺血性心脏病、高血压及心脏瓣膜病等情况下可引起心力衰竭的一种特殊形式的心脏疾病^[1-2]。DCM 的病理机制复杂,其中糖脂代谢紊乱、内皮功能障碍、肾素-血管紧张素系统激活、线粒体功能损伤与氧化应激等均可导致 DCM 发生^[3-4]。DCM 在影响糖尿病患者心力衰竭预后中起关键作用,随着糖尿病患者数量逐年上升,DCM 已成为导致这一群体死亡的主要原因之一^[5]。因此,选择有心血管保护作用的降糖药物是临床研究和治疗中亟待解决的问题^[6]。2016 年,一项 LEADER 研究证实,胰高血糖素样肽 1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激动剂利拉鲁肽可减少 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)人群的心血管事件,并降低心血管事件的死亡率^[7]。先前研究发现,利拉鲁肽可通过抗炎、抗凋亡和抗纤维化等机制发挥心脏保护作用^[8-9],尽管近年利拉鲁肽改善 DCM 心功能引起人们广泛关注,但有关利拉鲁肽对心肌代谢紊乱方面的研究相对有限。本研究旨在观察利拉鲁肽对 DCM 大鼠心功能及其心肌代谢异常的改善作用,并探讨潜在的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组处理

60 只 3 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,于中国医学科学院阜外医院动物实验中心所属的 SPF 级动物房适应性饲养 1 周后进入实验。大鼠按照随机数字表法从中随机选取 10 只作为正常对照组;其余 50 只大鼠给予高糖高脂饮食喂养 4 周;至第 5 周末腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)30 mg/kg,3 天后检测,若空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥ 16.7 mmol/L,且 7 天复测 FBG ≥ 16.7 mmol/L,为 T2DM 造模成

功。继续给予 T2DM 大鼠高糖高脂喂养 4 周后,经超声心动图检测出符合 DCM 模型的大鼠,共 36 只,再随机分为 DCM 模型组(DCM 组)、低剂量利拉鲁肽治疗组(LL 组)及高剂量利拉鲁肽治疗组(HL 组)3 组,每组各 12 只。然后继续高糖高脂喂养,同时 LL 组和 HL 组分别给予利拉鲁肽 100 $\mu\text{g/kg}$ 和 200 $\mu\text{g/kg}$ 腹腔注射,正常对照组和 DCM 组给予等体积生理盐水腹腔注射,共干预 12 周。随后经超声心动图检查心功能后麻醉处死大鼠。

1.2 超声心动图检测心功能

于利拉鲁肽治疗 12 周结束后使用异氟烷麻醉大鼠并使用 Vevo 2000 进行超声心动图检查,扫描大鼠胸骨旁左心室长轴和短轴切面,记录 M 超图线,测量左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS);并记录左心室舒张早期最大血流/二尖瓣心房收缩期最大血流比值(the ratio of early to late diastolic mitral flow velocities, E/A)。所有测量数值通过 6 个连续心动周期的平均值获取。

1.3 心肌组织代谢组学检测

实验结束处死各组大鼠后迅速于冰上精确称取 30 mg 心肌组织样本后加入 1.5 mL 的 EP 管中,加入内标(L-2-氯苯丙氨酸,0.3 mg/m;甲醇配置)20 μL 及甲醇-水(体积比 4:1)400 μL ;与钢珠(2 个)混合后于 -20°C 冰箱中预冷 2 min 并放入研磨机中 60 Hz 研磨 2 min;使用冰水浴超声提取 10 min 后静置于 -20°C 冰箱中 30 min;离心 10 min 后取 300 μL 上清液于 LC-MS 进样小瓶中,氮气吹干;于 200 μL 甲醇-水(体积比 1:4)中进行超声复溶(预先涡旋 30 s),后静置于 -20°C 冰箱中 2 h;离心 10 min,吸取 150 μL 的上清液并通过 0.22 μm 过滤器过滤后转移到 LC 进样小瓶,后于 -80°C 冰箱保存,直至进行 LC-MS 分析。质控样本(QC)制备是由所有样本的提取液等体积混合而成,体积与样本

体积一致。色谱条件: ACQUITY UPLC HSS 3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 柱温 45 °C, 流动相: A-水 (含 0.1% 甲酸), B-乙腈 (含 0.1% 甲酸), 流速 0.4 mL/min, 进样 2 μL。色谱梯度洗脱程序如下: 0~2 min, 95% A, 5% B。2~4 min, A 从 95% 变化至 70%, B 从 5% 变化至 30%。7~8 min, A 从 70% 变化至 50%, B 从 30% 变化至 50%。8~10 min, A 从 50% 变化至 20%, B 从 50% 变化至 80%。10~14 min, A 从 20% 变化至 0%, B 从 80% 变化至 100%。14~15 min, A 维持在 0%, B 维持在 100%。15~15.1 min, A 从 0% 变化至 95%, B 从 100% 变化至 5%。15.1~16 min, A 维持在 95%, B 维持在 5%; 质谱条件: ESI 离子源, 采用正负离子扫描模式进行样品质谱信号采集。

1.4 代谢组学数据预处理

将原始数据经代谢组学处理软件 Progenesis QI v2.3 软件 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化, 其主要参数: precursor tolerance 为 5 ppm/10 ppm (自建库), product tolerance 为 10 ppm/20 ppm (自建库), production threshold 为 5%。化合物的鉴定基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布, 使用 The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps (v2.3) 和 METLIN 数据库以及自建库进行定性。对提取到的数据, 删除组内缺失值均 (0 值) >50% 的离子峰, 并将 0 值以最小值的一半替换, 并根据化合物定性结果打分 (Score) 对定性得到的化合物进行筛选, 筛选标准为 36 分 (满分 60 分), 36 分以下视为定性结果不准确并删除。最后将正负离子数据合并成一个数据矩阵表, 该矩阵包含了原始数据提取到的所有可以用于分析的信息, 后续分析均以此为基础。

1.5 差异代谢物筛选

采用多维分析和单维分析相结合的办法, 来筛选组间差异代谢产物。将经过归一化后的差异代谢物筛选的数据通过 R 软件 (3.6.2 版本) 进行正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA) 获得变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 值, 用于寻找与疾病相关的差异代谢物。进一步利用 *t* 检验验证组间差异代谢物是否具有显著性。筛选的标准为 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP 值 >1, *t* 检验的 *P* 值 <0.05。将同时满足 VIP >1 和 *P* <0.05 的变量筛选为最终的差异代谢物。为了排除 OPLS-DA 模型存在过拟合的危险, 本研究采用随机置换检验 (经 100 次置换) 考察建立模型的有效性。

P <0.05 为差异有统计学意义。后将 DCM 组和正常对照组、LL 组和 DCM 组、HL 组和 DCM 组三组筛选的关键差异代谢物通过 R 软件取交集得到 29 种主要的关键差异代谢物。

1.6 代谢通路富集分析

利用差异代谢物的 KEGG ID 通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) Enrichment 数据库进行代谢通路富集分析, 获得代谢通路富集结果。应用超几何检验, 找出与整个背景相比, 在显著性差异表达代谢物中显著富集的通路条目, 其计算公式为:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

N 为代谢物总数; *n* 为 *N* 中差异表达代谢物的数目; *M* 为注释为某特定通路的代谢物数目; *m* 为注释为某特定通路的差异代谢物数目。以 *P* <0.05 为阈值, 满足此条件的通路为在差异代谢物中显著富集的通路。后将 DCM 组和正常对照组、LL 组和 DCM 组、HL 组和 DCM 组三组富集的代谢通路通过 R 软件取交集进行统计分析, 以 *P* <0.05 为阈值, 满足此条件的通路为关键差异代谢物主要显著富集的通路。

1.7 统计学分析

实验数据使用 SPSS 26.0 (美国 SPSS 公司) 和 Graphpad Prism 9.0 (美国 Graphpad 软件公司) 进行统计分析与图形构建。正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 用 Bonferroni 校正, *P* <0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 利拉鲁肽改善 DCM 大鼠心功能

超声心动图结果显示 (图 1), 与正常对照组相比, DCM 组大鼠的 LVEF 降低 13.5%, LVFS 降低 16.3%, E/A 比值升高 32.3% (均 *P* <0.01)。与 DCM 组相比, LL 组大鼠 LVEF 升高 10.8%, LVFS 升高 13.7%, E/A 比值降低 12.3% (均 *P* <0.05); HL 组大鼠的 LVEF 升高 14.9%, LVFS 升高 13.4%, E/A 比值降低 21.1% (均 *P* <0.05)。结果提示, LL 组和 HL 组左心室收缩和舒张功能受损明显减轻, 表明利拉鲁肽可显著改善 DCM 大鼠心功能。

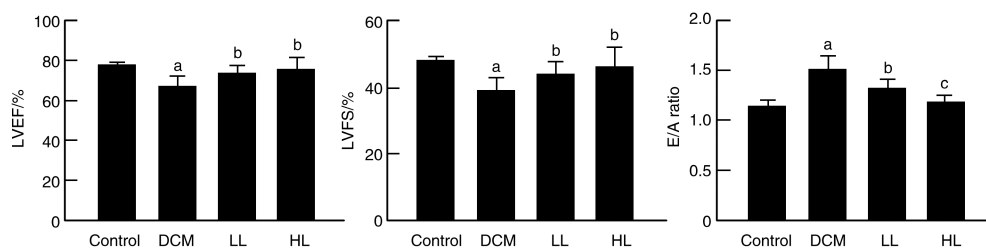


图 1. 利拉鲁肽可显著改善 DCM 大鼠左心室收缩和舒张功能

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 DCM 组比较。

Figure 1. Liraglutide can significantly improve left ventricular systolic and diastolic function in DCM rats

2.2 代谢组学分析

2.2.1 心脏组织样本质控分析 在 DDA 扫描模式下, 分别对正常对照组、DCM 组、LL 组、HL 组进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。结果显示, 各组之间显著区分且对应的模型参数如下。DCM 组/正常对照组: $R^2X(\text{cum}) = 0.668$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.977$, $Q^2(\text{cum}) = 0.878$, $R^2 = 0.744$, $Q^2 =$

-0.712 ; LL 组/DCM 组: $R^2X(\text{cum}) = 0.801$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.995$, $Q^2(\text{cum}) = 0.425$, $R^2 = 0.983$, $Q^2 = -0.527$; HL 组/DCM 组: $R^2X(\text{cum}) = 0.549$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.914$, $Q^2(\text{cum}) = 0.53$, $R^2 = 0.785$, $Q^2 = -0.43$; 以上参数说明各比较组模型拟合准确性较高, 且无过拟合情况, 说明所建模型稳定可靠 (图 2)。

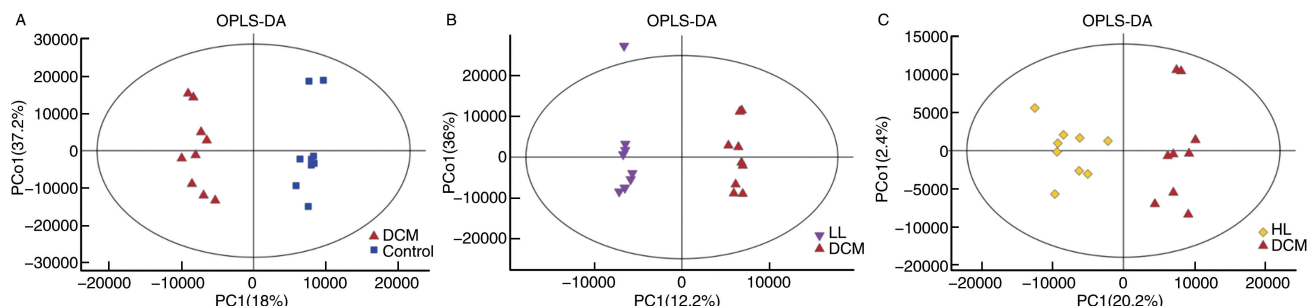


图 2. OPLS-DA 得分图

A、B、C 分别为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组的 OPLS-DA 得分图。

Figure 2. OPLS-DA score chart

2.2.2 潜在关键差异代谢物筛选 与正常对照组相比, DCM 组有 239 种代谢物表达存在显著差异表达 ($P < 0.05$), 其中差异最显著的 5 种代谢物中磷脂酰胆碱 [16 : 0/20 : 4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)]、磷脂酰乙醇胺 (16 : 0/0 : 0)、溶血磷脂酰乙醇胺 [0 : 0/18 : 0; 18 : 1 (11Z)/0 : 0] 表达下调, 而 1-磷酸果糖、2-油酰-1-棕榈锡甘油-3-磷酸胆碱则表达上调。与 DCM 组相比, LL 组大鼠有 116 种代谢物表现出明显的差异表达 ($P < 0.05$), 其中差异最显著的 5 种代谢物中 2-O-(5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酰基)-1-O-十六烷基甘油-3-磷酸胆碱、磷脂酰胆碱 [16 : 0/20 : 4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)] 表达上调, 剩余磷脂酰胆碱 [18 : 2 (9Z, 12Z)/0 : 0; 18 : 2 (2E, 4E)/0 : 0]、磷脂酰乙醇胺 (P-18 : 0/0 : 0)、溶血磷脂酰胆碱 (P-16 : 0)、溶血磷脂酰乙醇胺 [18 : 2 (9Z, 12Z)/0 : 0] 均表达下调。与 DCM 组相比, HL 组大鼠则

有 187 种代谢物存在显著差异表达 ($P < 0.05$), 其中差异最显著的 5 种代谢物: 对映 PAFC-16、磷脂酰胆碱 [16 : 0/0 : 0] [rac]; 18 : 2 (9Z, 12Z)/0 : 0; 0 : 0/20 : 4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z); 0 : 0/18 : 0; 0-1 : 0/16 : 0]、NeuAcalpha2-3 半乳糖-Cer (d18 : 1/16 : 0)、2-油酰-1-棕榈锡甘油-3-磷酸胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺 (0 : 0/18 : 0) 全部表达下调 (图 3)。

为了筛选出在 DCM 组、LL 组和 HL 组大鼠心肌组织中表达均有差异的代谢物, 将以上 3 组差异代谢物再取交集, 得到 29 种差异代谢物 (图 4A)。其中, 磷脂酰胆碱 [P-18 : 0/0 : 0; 20 : 3 (5Z, 8Z, 11Z)/0 : 0; 0-18 : 1 (11Z)/0 : 0; (16 : 0/0 : 0) [U]]; (8 : 0/8 : 0) [U]; 18 : 3 (9Z, 12Z, 15Z)/0 : 0) [U]]、磷脂酰乙醇胺 [P-18 : 0/0 : 0; 19 : 1 (9Z)/0 : 0; 19 : 0/0 : 0]、花生四烯基肉碱、3-羟基二十烷酰肉碱、异亮氨酰脯氨酸、2-氨基乙基磷胆碱、溶血

磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱、愈伤酸、甘油-3-磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、ACRL 毒素 II、疏螺旋体、甘草脱氧胆酸 7-硫酸盐、(1S,16R)-5,7,11-三羟基-3-[3-羟基-1-(2-甲基-1,3-噻唑-4-yl)]-8,8,10,12,

16-五甲基-17-氧-4-叠氮[14.1.0]十七烷共 22 种差异代谢物在 DCM 大鼠心肌组织中上调,而利拉鲁肽可下调上述代谢物的表达,因此考虑该 22 种物质与利拉鲁肽改善 DCM 大鼠心肌代谢相关(图 4B)。

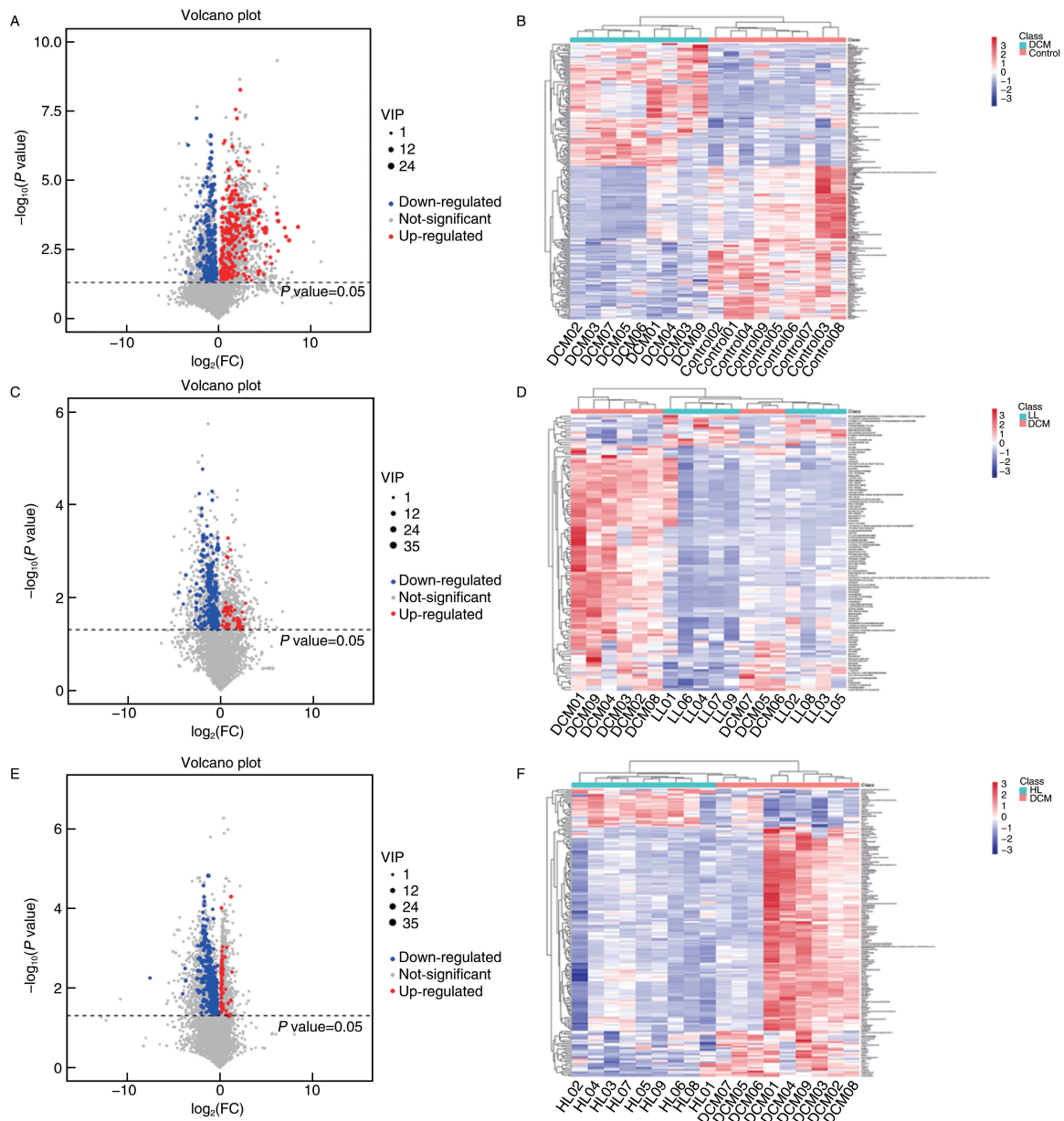


图 3. 差异表达分析

A、C、E 分别为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组差异代谢物的火山图;
B、D、F 分别为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组差异代谢物的横纵聚类图。

Figure 3. Differential expression analysis

2.2.3 代谢通路富集 为进一步明确差异代谢物的功能,我们对筛选出的差异代谢物进行通路富集分析。以 $P < 0.05$ 为筛选标准,DCM 组与正常对照组的差异代谢物富集通路有 13 条,主要富集在氨酰 tRNA 生物合成,蛋白质消化和吸收,ABC 转运

体,组氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,泛酸和辅酶 A 的生物合成, β -丙氨酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢,胆碱代谢等代谢通路上(图 5A、B)。LL 组相对于 DCM 组的差异代谢通路有 6 条,分别为胆碱代谢、咖啡因代谢、嘌呤代谢、 α -亚麻酸

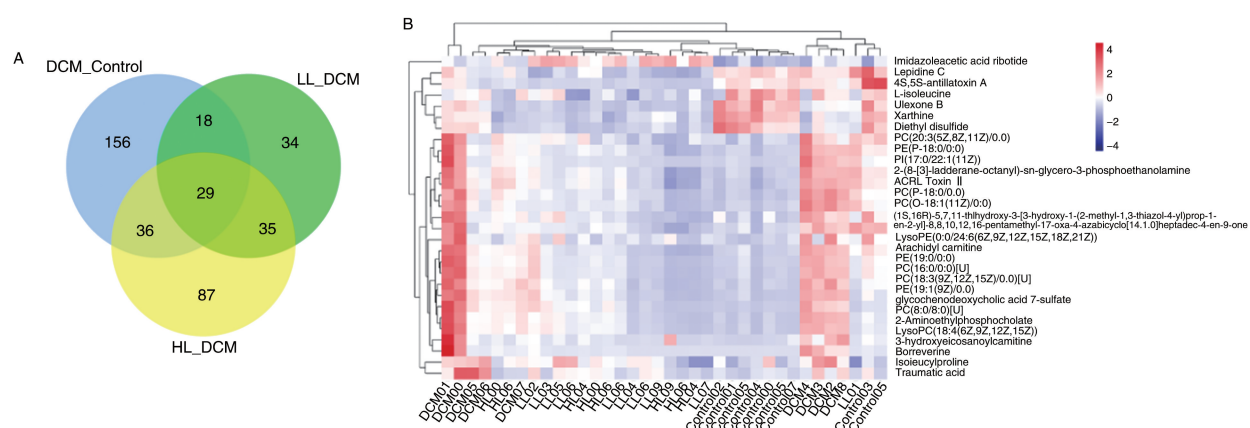


图 4. 差异代谢物交集韦恩图与横纵聚类图
A 为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组差异代谢物交集韦恩图;B 为三组差异代谢物交集的横纵聚类图。
Figure 4. Intersection Venn diagram and Horizontal and vertical cluster plots of differential metabolites

代谢、组氨酸代谢及甘油磷脂代谢通路,其中胆碱代谢通路具有最显著差异(图 5C、D)。HL 组相对于 DCM 组的差异代谢通路有 20 条,其中嘌呤代谢、FoxO 信号通路、蛋白质消化和吸收、组氨酸代谢、血小板活化、脂肪细胞脂肪分解的调节、赖氨酸降解、氨酰-tRNA 生物合成、肾素分泌、帕金森病、醛固酮的合成和分泌等通路富集显著(图 5E、F)。

为了筛选关键代谢物主要涉及的代谢通路,我们将以上三组通路富集取交集发现,参与利拉鲁肽对 DCM 大鼠心肌代谢改善作用的关键代谢物可能主要涉及 3 条代谢通路($P<0.05$):胆碱代谢通路、咖啡因代谢通路以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成通路。其中,胆碱代谢通路差异最显著,提示该通路可能参与利拉鲁肽对 DCM 大鼠心肌代谢的改善作用(图 6)。

3 讨论

DCM 是糖尿病患者常见的心血管并发症,其特征是心肌纤维化、僵硬和肥大,进而导致心脏结构和功能异常,引起心脏舒张和收缩功能障碍,最终演变至心力衰竭。新近研究发现,心肌代谢紊乱在 DCM 疾病进展过程中发挥重要作用^[5,10]。本研究发现,利拉鲁肽能够显著改善 DCM 大鼠心功能;同时,代谢组学结果显示心肌代谢紊乱也得到明显改善,其中关键差异代谢物包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、异亮氨酰脯氨酸、2-氨基乙基磷胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱等 29 种,涉及胆碱代谢、咖啡因代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 3 条代谢通路,其中胆碱代谢通路差异

最为显著。
DCM 早期心功能改变表现为左心室舒张功能障碍,随疾病进展至中晚期左心室收缩功能障碍,心功能严重受损并出现心力衰竭^[11-14]。传统超声心动图可通过测量舒张期二尖瓣口 E 峰、A 峰速度及 E/A 比值用来评价左心室舒张功能,正常生理情况下,E/A 比值 >1 ;DCM 早期左心室舒张功能障碍时 E/A 比值 <1 ,然而随着 DCM 进展至晚期收缩功能和舒张功能均异常时,也可出现 E/A 比值 >1 ,即“假性正常化”现象^[11,15]。蔡等^[6]发现与对照组相比,DCM 大鼠 LVEF、LVFS 明显下降,而 E/A 比值明显升高。此外,Li 等^[5]的研究也在 DCM 小鼠模型中证实,与对照组相比,DCM 小鼠的 LVEF、LVFS 显著降低,提示左心室舒张和收缩功能受损。本研究发现,DCM 大鼠 LVEF 和 LVFS 明显降低,且 E/A 比值大于 1.5,提示 DCM 大鼠左心室舒张和收缩功能障碍同时出现,本研究结果与既往研究相一致。随着 LEADER 研究证实利拉鲁肽具有心血管获益效应,其对心血管保护作用及机制研究也引起研究者较大兴趣。一项 2 型糖尿病合并心力衰竭患者的短期随机研究发现,利拉鲁肽治疗可明显提高患者的 LVEF^[16]。Trang 等^[9]研究表明,利拉鲁肽治疗可以显著降低 DCM 大鼠左心室舒张期末内径(left ventricular end diastolic dimension,LVED)、左心室收缩期末内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVESD)、舒张期末容积(end-diastolic volume,EDV)和收缩期末容积(end-systolic volume,ESV),增加 LVEF 及 LVFS,减轻左心室舒张和收缩功能障碍。本研究中,我们同样发现,与 DCM 大鼠相比,利拉鲁肽治疗组(LL 组和 HL 组)大鼠 LVEF 和 LVFS 显著

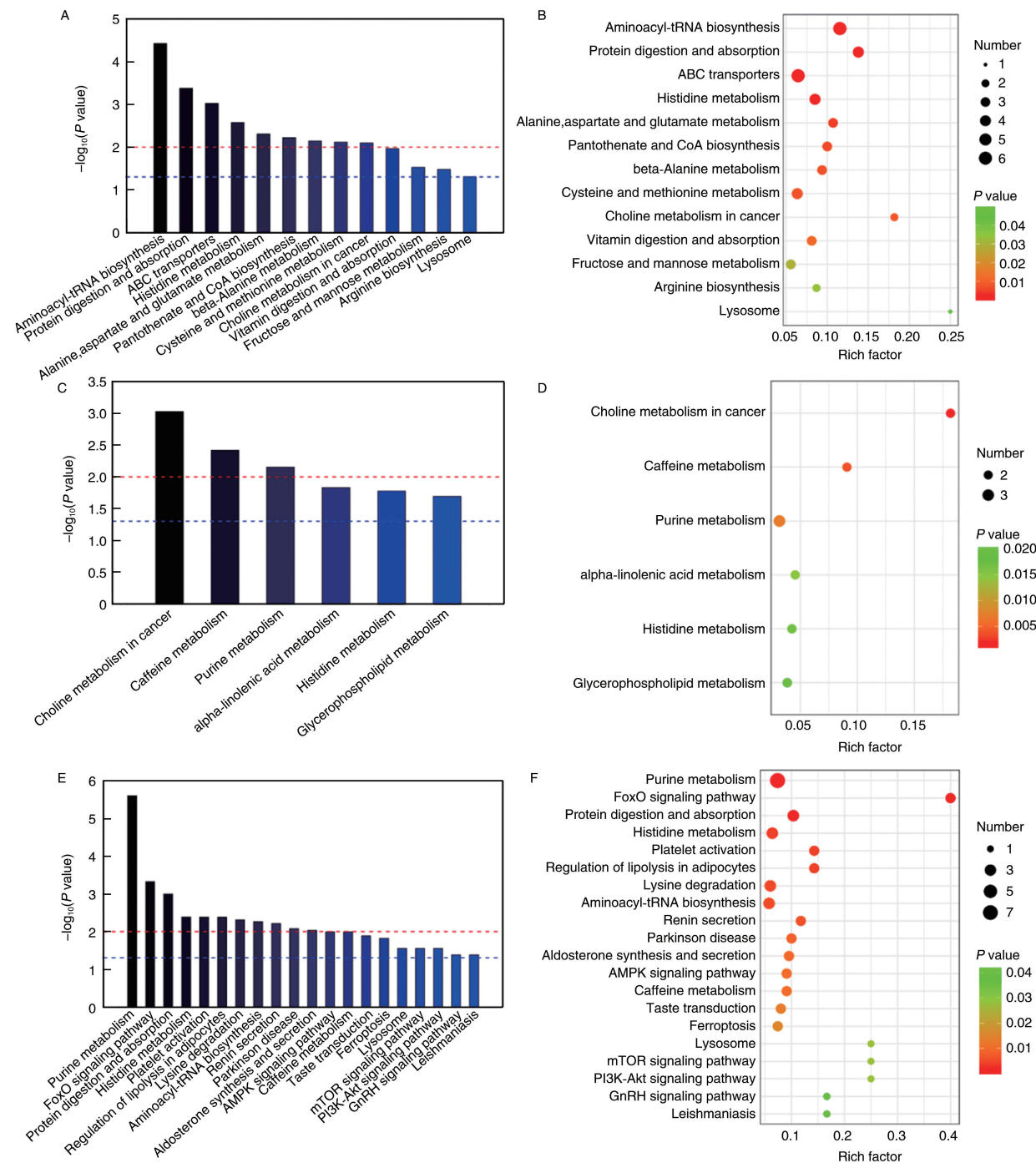


图 5. 代谢通路柱状图、气泡图

A、C、E 分别为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组差异代谢物代谢通路富集柱状图，
B、D、F 分别为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组差异代谢物代谢通路富集气泡图。

Figure 5. Metabolic pathway bar charts, bubble chart

增加,E/A 比值降低至 1.0 左右,趋于正常范围,说明利拉鲁肽可明显改善 DCM 大鼠心功能。

尽管利拉鲁肽能够改善 DCM 患者心功能,但其作用机制尚未完全阐明。新近研究发现,心肌代谢紊乱在 DCM 疾病进展过程中发挥重要作用^[17]。Faulkner 等^[10]通过代谢组学研究发现,心力衰竭合

并 2 型糖尿病小鼠中,心脏脂质代谢最为显著,其中甘油二酯、脂肪酸和三酸甘油酯等脂质类代谢物积累产生的毒性细胞效应可干扰胰岛素敏感的信号通路,促进 DCM 疾病进展。Sun 等^[2]发现在 2 型糖尿病小鼠中,脂质和脂肪酸代谢过程涉及最多,其中黄酮、氨基酸、磷酸果糖、甘油酯和酰胺类等与糖

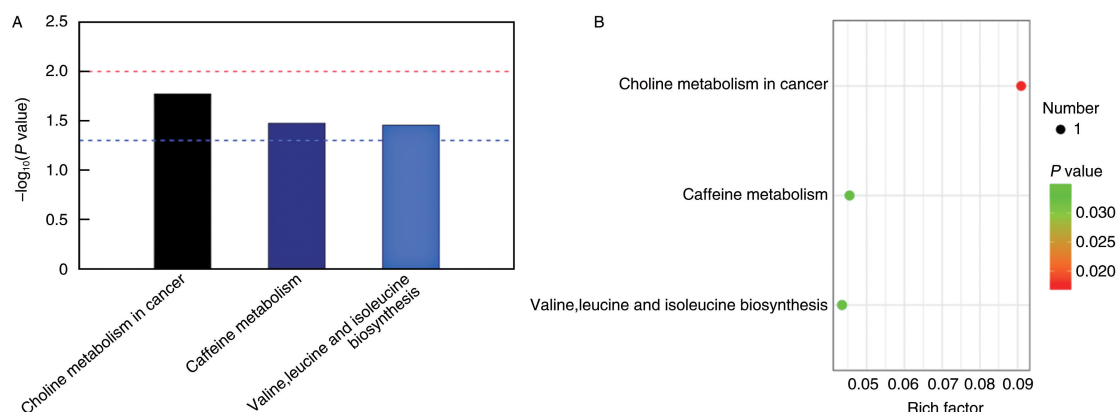


图 6. 代谢通路柱状图、气泡图

A 为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组三组代谢通路交集柱状图，
B 为 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组三组代谢通路交集气泡图。

Figure 6. Metabolic pathway bar charts, bubble chart

尿病引起的心血管疾病密切相关。Zhao 等^[18]利用代谢组学检测发现,与对照组相比,DCM 大鼠心脏葡萄糖代谢途径被减弱或抑制,几乎不通过该代谢途径产生能量。本研究代谢组学检测共发现 395 种代谢物,其中 DCM 组与正常对照组、LL 组与 DCM 组、HL 组与 DCM 组各自富集出组间差异代谢物分别为 239 种、116 种、187 种,以上三组共交集出关键差异代谢物 29 种。上述关键差异代谢物涉及 3 条代谢通路,包括胆碱代谢通路、咖啡因代谢通路和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路,其中胆碱代谢通路差异最为显著。本研究发现,与正常对照组相比,DCM 组有 22 种关键差异代谢物表达显著上调($P < 0.05$),其中包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺及异亮氨酰脯氨酸等;而剩余 7 种关键差异代谢物表达明显下调,其中包括黄嘌呤、5S-抗霉素 A、芥子酮 B 等。既往脂质组学研究也证实磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺为 DCM 的标志物,在 DCM 大鼠心肌代谢中表达异常升高^[19]。然而既往也有研究显示不同的结果,Li 等^[5]发现与对照组相比,STZ 诱导的糖尿病小鼠心脏组织中 8 种长链羟基肉毒碱、6 种酰基肉毒碱等有毒脂质种类表达上调,而磷脂酰肌醇、溶血磷脂酰乙醇胺及溶血磷脂酰胆碱表达下调。且该研究数据表明,有毒脂质的增加和磷脂的减少可促使线粒体损伤和 ATP 缺乏,进而导致小鼠糖尿病性心功能障碍。本研究发现,利拉鲁肽可以显著降低 DCM 大鼠心肌组织中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺及异亮氨酰脯氨酸的含量,而黄嘌呤、5S-抗霉素 A、芥子酮 B 的含量则显著升高。我们推测利拉鲁肽可能主要通过调节磷脂酰胆碱等胆碱

代谢通路物质进而改善 DCM 大鼠心功能,该结果拓宽了对利拉鲁肽心血管保护作用机制的认识,然而其确切调控靶点尚需进一步实验验证。

胆碱是构成细胞膜结构和脂蛋白的重要成分,发挥如调控细胞凋亡、促进脂肪代谢、降低血清胆固醇等重要的生理作用。新近研究发现,胆碱通过激活 Akt/mTOR 信号通路抑制大鼠心肌缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬,从而发挥保护心脏的作用^[20]。胆碱作为主要神经递质乙酰胆碱的前体,还可以保护大鼠心脏免受阿霉素诱导的心脏毒性及其潜在的影响^[21]。然而,目前为止关于胆碱通路及其代谢物对心血管系统的影响尚无明确定论。有研究表明磷脂酰胆碱的肠道菌群代谢物可导致心血管疾病发生。研究发现,在小鼠的膳食中补充胆碱不仅可造成巨噬细胞脂质蓄积显著增加,并且可产生氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)是动物内常见的胆碱代谢产物,与心血管疾病风险强烈相关,提示膳食游离胆碱可促进动脉粥样硬化的发生发展^[22]。既往多项研究也发现,在心肌缺血和 DCM 中,溶血磷脂酰胆碱积聚在肌纤维膜上并可使膜稳定性受损^[22-23],从而导致心脏电生理异常并诱发心律失常^[24]。一项 Saguenay 研究在鉴定出的 69 种甘油磷脂酰胆碱(glycero-3-phosphocholine, GPC)中发现了一种新脂质种类 PC(16:0/2:0),与多种心血管疾病危险因素表现出了最强的关联性,但该脂质是否可以作为心血管疾病的新标志物,以及其具体作用机制有待进一步研究^[25]。目前胆碱通路及其代谢物在心血管疾病中的作用仍未完全明确,未来尚需要更多研究以进一步全面阐明胆碱代谢通路对心脏及血管的作用及相关分子机制。

综上所述,本研究借助非靶向代谢组学方法检测并分析利拉鲁肽治疗对 DCM 大鼠心肌组织代谢物的影响,首次发现胆碱代谢通路在利拉鲁肽改善 DCM 大鼠异常心肌代谢中的重要性,并推测利拉鲁肽改善心功能的作用可能与此机制相关,为 DCM 临床治疗潜在作用靶点的选择提供了一定的研究基础。

[参考文献]

- [1] XI Y B, CHEN D, DONG Z, et al. Multi-omics insights into potential mechanism of SGLT2 inhibitors cardiovascular benefit in diabetic cardiomyopathy[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 999254.
- [2] SUN J, XU J, LIU Y, et al. Proteomic and metabolomic analyses reveal the novel targets of spermine for alleviating diabetic cardiomyopathy in type II diabetic mice[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1022861.
- [3] ZHANG Y W, ZHANG Z Y, LI C D, et al. Metabolomics study reveals the alteration of fatty acid oxidation in the hearts of diabetic mice by empagliflozin[J]. *Mol Omics*, 2022, 18(7): 643-651.
- [4] RITCHIE R H, ABEL E D. Basic mechanisms of diabetic heart disease[J]. *Circ Res*, 2020, 126(11): 1501-1525.
- [5] LI W, YAO M, WANG R, et al. Profile of cardiac lipid metabolism in STZ-induced diabetic mice[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 231.
- [6] 蔡欢, 何玉秀, 刘静芹, 等. 利拉鲁肽改善糖尿病心脏病大鼠心脏脂质异位沉积的效果和机制研究[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(10): 1013-1020.
- [7] CAI H, HE Y X, LIU J Q, et al. Beneficial effects and mechanisms of liraglutide on improving cardiac ectopic lipid deposition and protecting cardiac function in diabetic cardiomyopathy rats[J]. *Chin Circ J*, 2019, 34(10): 1013-1020.
- [7] MARSO S P, DANIELS G H, BROWN-FRANSEN K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(4): 311-322.
- [8] DEC G W. Which drug will 'Lead' in reducing cardiac events among heart failure patients with diabetes? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(10): 1142-1144.
- [9] TRANG N N, CHUNG C C, LEE T W, et al. Empagliflozin and liraglutide differentially modulate cardiac metabolism in diabetic cardiomyopathy in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1177.
- [10] FAULKNER A, DANG Z X, AVOLIO E, et al. Multi-omics analysis of diabetic heart disease in the db/db model reveals potential targets for treatment by a longevity-associated gene[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1283.
- [11] SHAH A M, SHIN S H, TAKEUCHI M, et al. Left ventricular systolic and diastolic function, remodelling, and clinical outcomes among patients with diabetes following myocardial infarction and the influence of direct renin inhibition with aliskiren[J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14(2): 185-192.
- [12] 周嘉琪, 林介夫, 陈嘉佳, 等. 靶向 CD36 调控脂质代谢: 糖尿病心脏病防治新靶点[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(12): 1013-1019.
- [12] ZHOU J Q, LIN J F, CHEN J J, et al. Targeting CD36 to regulate lipid metabolism: a new strategy for the prevention and treatment of diabetic cardiomyopathy[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(12): 1013-1019.
- [13] ZHAN J, JIN K, XIE R, et al. AGO2 protects against diabetic cardiomyopathy by activating mitochondrial gene translation[J]. *Circulation*, 2024, 149(14): 1102-1120.
- [14] MA X, MEI S, WUYUN Q, et al. Epigenetics in diabetic cardiomyopathy[J]. *Clin Epigenetics*, 2024, 16(1): 52.
- [15] LITWIN S E, RAYA T E, ANDERSON P G, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. Changes in active and passive properties of the left ventricle[J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(2): 481-488.
- [16] LIANG B, GU N. Liraglutide in the treatment of heart failure: insight from FIGHT and LIVE[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 106.
- [17] TAYANLOO-BEIK A, ROUDSARI P P, REZAEI-TAVIRANI M, et al. Diabetes and heart failure: multi-omics approaches[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 705424.
- [18] ZHAO L C, DONG M J, XU C C, et al. Identification of energy metabolism changes in diabetic cardiomyopathy rats using a metabolomic approach[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(3): 934-946.
- [19] DONG S, ZHANG R, LIANG Y, et al. Changes of myocardial lipidomics profiling in a rat model of diabetic cardiomyopathy using UPLC/Q-TOF/MS analysis[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2017, 9: 56.
- [20] HANG P Z, ZHAO J, SU Z L, et al. Choline inhibits ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte autophagy in rat myocardium by activating Akt/mTOR signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 2136-2144.
- [21] WANG Z N, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [22] CORR P B, CREER M H, YAMADA K A, et al. Prophylaxis of early ventricular fibrillation by inhibition of acylcarnitine accumulation[J]. *J Clin Invest*, 1989, 83(3): 927-936.
- [23] GROSS R W. Myocardial phospholipases A(2) and their membrane substrates[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 1992, 2(3): 115-121.
- [24] MAKINO N, DHALLA K S, ELIMBAN V, et al. Sarcolemmal Ca²⁺ transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats[J]. *Am J Physiol*, 1987, 253(2 Pt 1): E202-E207.
- [25] SYME C, CZAJKOWSKI S, SHIN J, et al. Glycerophosphocholine metabolites and cardiovascular disease risk factors in adolescents[J]. *Circulation*, 2016, 134(21): 1629-1636.

(此文编辑 许雪梅)