

高尿酸血症大鼠模型血清代谢组学研究

迪丽达尔·希力甫¹, 赵龙¹, 张向阳²

1. 新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011

摘要 通过检测高尿酸血症大鼠血清代谢谱的变化, 探讨代谢组学在高尿酸血症研究中的应用。将20只清洁级健康SD (Sprague-Dawley)大鼠随机分为高尿酸血症模型组(10只)和空白对照组(10只), 每日采用酵母膏(YEP)21 g·kg⁻¹·d⁻¹给予喂养, 氧尿酸钾(OA)以200 mg⁻¹·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射1次, 建立高尿酸血症大鼠模型。第28日收集空白对照组和模型组大鼠血清, 进行¹H-NMR谱测定和主成分分析。与空白对照组大鼠相比, 模型组大鼠血清中糖蛋白、丙酮酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸显著增加, 而甲酸浓度及极低密度脂蛋白、不饱和脂肪酸、丙酮显著降低。由此得出, 高尿酸血症大鼠血清代谢组学发生明显变化, 血浆代谢组学在一定程度上反映高尿酸血症大鼠的病理生理变化。

关键词 高尿酸血症; 代谢组学; 大鼠模型; ¹H-NMR谱

中图分类号 R589.7

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.16.012

Serum metabonomics research of hyperuricemia rat model

SHERIP Dildar¹, ZHAO Long¹, ZHANG Xiangyang²

1. Center of Cardiology of the Frist Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract The serum metabonomic variation in hyperuricemia rats was investigated in order to explore the application of metabonomics in research of hyperuricemia. The animals were divided into two groups at random, i.e., the normal group ($n=10$) and the model group ($n=10$). The rat model was treated with yeast extract powder(YEP) as 21 g·kg⁻¹·d⁻¹ and OA paired 20 g/L mother liquor with sterile distilled water. The two group's serum was collected and its ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectra was acquired. Compared with the normal control group, the model group's glycoprotein, pyruvic acid, alanine, isoleucine, leucine were all increased, however, formaldehyde, VLDL, unsaturated fatty acid, and acetone were reduced. Significant changes in serum metabonomics found in the hyperuricemia rat models might reflect to a certain extent the pathological changes of hyperuricemia rat models.

Keywords hyperuricemia; metabonomics; rat models; ¹H-NMR spectra

尿酸是嘌呤分解代谢的最终产物。体内血尿酸增高时引起脂肪代谢、糖代谢及氨基酸代谢的紊乱, 导致内皮功能紊乱或炎性因子的增加, 高尿酸血症与全身代谢异常密切相关。半个世纪以来, 大量研究表明, 高尿酸血症与高血压、血

脂异常、肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病等有着共同的发病基础——代谢综合征^[1-3], 高尿酸血症也是高血压、血脂异常、肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病等疾病发生发展中的主要危险因素^[4]。代谢组学虽然是一个新领域^[5-7], 但是在研究疾病发病

收稿日期: 2014-11-06; 修回日期: 2015-06-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区青年自然科学基金项目(2014211C073)

作者简介: 迪丽达尔·希力甫, 博士研究生, 研究方向为冠心病, 电子信箱: 44451520@qq.com; 张向阳(通信作者), 教授, 研究方向为冠心病, 电子信箱: dildar328@hotmail.com

引用格式: 迪丽达尔·希力甫, 赵龙, 张向阳. 高尿酸血症大鼠模型血清代谢组学研究[J]. 科技导报, 2015, 33(16): 77-80.

机制和治疗药物开发产业提供了一个显著的系统性生物学的方法,已在微生物和植物研究、药物毒性和机理研究、疾病诊治、疾病机制的阐明以及疾病相关生物标志物的发现和动物模型等领域中获得了较广泛地应用。故基于代谢组学技术的特点及优势,高尿酸血症代谢组学分析正逐步体现出越来越大的临床价值。本研究应用代谢组学研究技术,测试和比较正常对照组和模型组大鼠血浆中所包含的代谢产物,探讨高尿酸血症相关的特异性标志物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD(Sprague-Dawley)大鼠:清洁级健康SD雄性大鼠20只,周龄6周,体重(200±17)g,由新疆医科大学动物实验中心提供。饲养条件:每笼5只,在温度22~25℃、相对湿度45%~60%、光照周期12 h:12 h环境中,适应饲养1周后开始进行实验,整个实验过程中自由摄食饮水。

1.2 主要实验仪器及药物

酵母膏(yeast extract paste, YEP),北京奥博星生物技术有限责任公司生产,产品批号:20090705。氧嗪酸钾盐(oxonic acid potassium salt, 97%, OA)为德国Aldrich公司,产品批号:20120312。

1.3 研究方法

将24只SD大鼠分组,包括空白对照组(N), YEP+OA 200 mg⁻¹·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射组(YOIH);按YEP和普通饲料按照质量比1:4配置而成,将YEP均匀拌入粉碎的大鼠颗粒饲料中重新压粒成形,以YEP 21 g·kg⁻¹·d⁻¹给予喂养,OA用灭菌热蒸馏水配成2 g/100 mL的混悬液,模型组每日给药1次,持续给药28 d,空白对照组普通饲料,自由饮水。在大鼠药物干预实验的第28天,经摘眼球采集大鼠血(非抗凝血)1 mL,离心分离血清、分装并保存于-80℃冰箱至进行核磁共振检测。

1.4 ¹H-NMR谱检测与分析

将血清样品室温溶解,取400 μL血清,加入200 μL buffer生理盐水溶液,高速恒温离心(4℃, 10 min, 10000 r/min)后,取上清液放入5 mm NMR样品管中,样品量均为0.55 mL。血浆的¹H-NMR谱图在新疆医科大学分析测试中心实验室进行检测,于25℃在Varian Unity INOVA 600型NMR谱仪上用CPMG自旋回波序列结合预饱和压水序列进行测试,回波时间为2 ms,32768个数据点,累加128次,采样谱宽为10000 Hz,以α-葡萄糖(δ_H 5.233)为内标进行定标。数据采集后进行相位校正,基线校正。按默认范围δ 9~0.5,每段为0.003进行分段并积分,同时排除以溶剂(D₂O)峰为中心的部分δ 4.67~5.2,将所产生的所有积分数据导入到Excel内并进行归一化处理。以R²X、R²Y和Q²作为所建立模型的质量评价指标。R²X描述模型的优化程度,R²Y描述反应变量Y的变异百分比,用交叉核实参数Q²描述模型的累积预测程度、表示预测结果的真实性。Q²>0.5被认为模型的预测结果“良”,Q²>0.9被认为模型的预测结果“优”。

1.5 主成份分析法(PCA分析法)

利用Simca-P软件包对¹H-NMR谱峰积分值进行PCA分析,得到PC图求出主成分(principal components, PC),利用PC对各组大鼠血浆的代谢组进行分析。

2 结果与分析

2.1 ¹H-NMR谱分析

YOIH组(YEP联合OA 200 mg⁻¹·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射组)干预4周后,血清尿酸明显升高的SD大鼠组血清中出现与尿酸有关的代谢紊乱。高尿酸血症组及空白对照组血清的¹H-NMR谱如图1所示。在每组血清对¹H-NMR可以发现氨基酸、糖蛋白等内源性代谢产物。此物质存在于多种生化过程中糖代谢,脂肪代谢和氨基酸代谢,故其氢谱图可作为代谢谱用来说明高尿酸血症组血清中内源性代谢产物的变化。

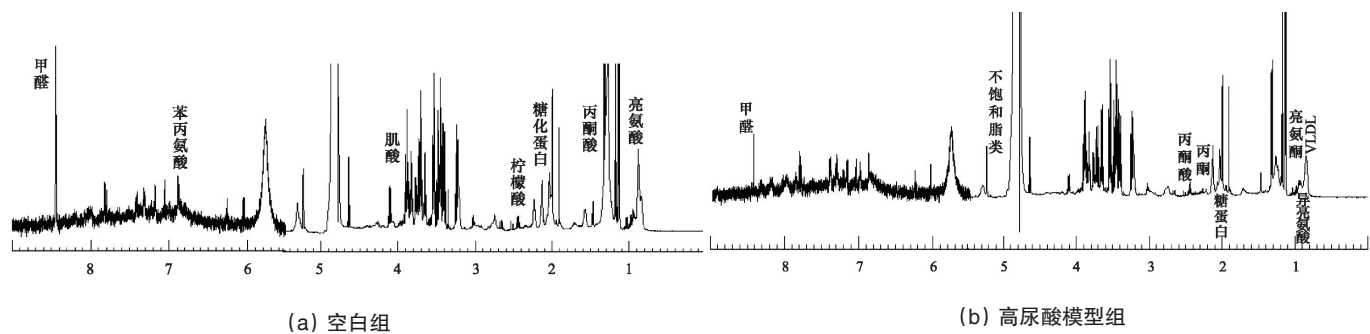


图1 高尿酸血症大鼠血清典型的¹H-NMR谱

Fig. 1 Typical ¹H-NMR spectrum of hyperuricemia rat model

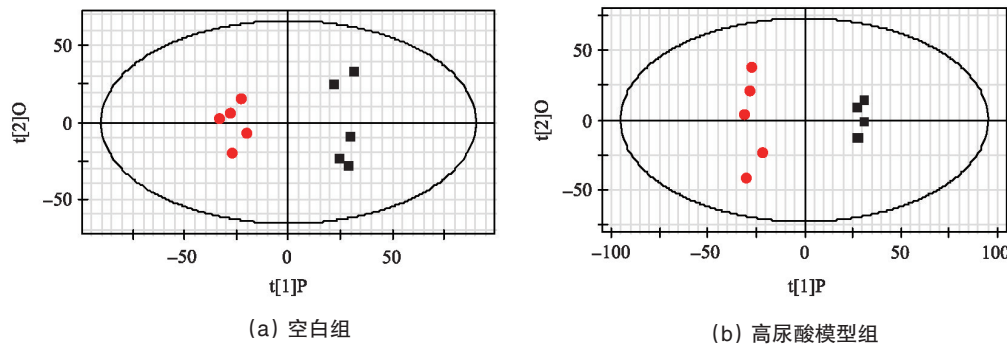
2.2 样本的偏最小二乘判别分析(PLS-DA)

在每组血清对¹H-NMR谱进行分段积分后的积分值进行OPLS-DA分析中,R²X=0.64,Q²=0.67。图2中显示各组均

有明显区分,表明各组血清在代谢成份上有明显差异,从正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)相关系数中获取每两组的差异性代谢组学的化学位移并与相关系数r结合确定差

异程度,从获取图可直观地显示出每个血清标本在空间上的位置,其中每个点代表一个谱峰段,获取图中高尿酸血症血清标本明显分开,表明两组血清代谢物组存在显著的差异。

根据以上信息及用 ^1H - ^1H 同核相关谱(COSY谱),质子全相关谱(TOCSY谱),J-分解谱(J-Resolved谱)等核磁共振二位谱技术确定了各组大鼠血清差异性代谢成分(表1)。



图中■为药物干预前,●为药物干预后,其中 $R^2X=0.64$, $R^2Y=0.70$, $Q^2=0.67$

图2 高尿酸血症大鼠血清 ^1H -MR 图谱数据的OPLS-DA分析得分图

Fig. 2 OPLS-DA score's plot generated from ^1H -NMR spectra from serum from hyperurecemia rat model

表1 高尿酸血症大鼠血清主要差异性代谢物及其相关系数

Table 1 Difference of metabolites of hyperuricemia rat models and the correlation coefficient

序号	代谢物	归属	化学位移	相关系数
1	脂类(VLDL)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n, \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$	0.85(m), 0.88(m), 1.27(m), 1.57(m)	-0.96
2	不饱和脂类	$\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}, \text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$	5.24(m), 5.24(m), 5.28(m), 5.30(m)	0.97
3	异亮氨酸	$\delta\text{-CH}_3, \beta\text{-CH}_3$	0.93(t), 1.00(d)	-0.98
4	亮氨酸	$\delta\text{-CH}_3, \beta\text{-CH}_2$	0.95(d), 1.72(m)	-0.96
5	糖蛋白	NHCO-CH_3	2.03(s)	-0.91
6	丙酮	CH_3	2.23(s)	0.94
7	丙酮酸	CH_2	2.36(s)	-0.87
8	甲醛	CH	8.45(s)	0.97

注:s为单峰;d:双峰;t为三重峰;q为四重峰;m为多峰;dd为双双重峰;ddd为三双重峰。

2.3 两组大鼠血清代谢组学分析

每组大鼠血清多种代谢组学分析有明显的差异。从表1中看出,与空白对照组比较,有差异性的代谢物中相关系数为正值则表明该组血清中上升的代谢物,相关系数为负值则表示血清中减少的代谢物。高尿酸血症大鼠血清中与糖代谢(糖蛋白、丙酮酸)、氨基酸代谢(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)有关的中间产物或终产物浓度较干预前显著增加,与空白组相差异有统计学意义($P<0.05$)。而甲酸浓度及脂肪代谢(极低密度脂蛋白、不饱和脂肪酸、丙酮)显著降低,可能因这些物质在应激状态下直接或间接参与三羧酸循环而过度消耗,并且差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

代谢组学是指通过从机体生命活动的最终代谢产物入手进而研究机体在一段生命周期内,因内在因素或外在因素

引起代谢网络特征规律动态变化的新近学科。从病理性改变方面而言,通过研究代谢产物量与质的经时变化来直接反映疾病的发生、发展及演变。

目前,对于高尿酸血症的血清代谢组学方面的研究报道极少,本研究选用雄性SD大鼠,选择酵母膏联合200 mg/kg OA腹腔注射制备大鼠高尿酸血症模型,不仅具有血清尿酸水平升高迅速、维持时间长,肾功能损伤程度较轻,无受试对象死亡等特点,还可以影响到心脏、大、小动脉等组织器官引起高尿酸引发的继发性病理改变,对于研究高尿酸血症与心血管疾病的相互作用机制,高尿酸血症的药物治疗提供了较理想的动物模型配伍剂量^[8]。研究4周时代谢组学分析结果显示,模型老鼠血清尿酸升高时,与糖代谢(糖蛋白、丙酮酸)、氨基酸代谢(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)有关的中间产物或终产物浓度(质量分数91.79%)较干预前显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),而甲酸浓度及脂肪代谢(极低密度脂蛋白、不

饱和脂肪酸、丙酮)显著降低($P<0.05$),较全面地提示了血清尿酸升高时机体内所产生的代谢异常。

研究发现,血清尿酸升高时可以引起糖代谢紊乱而使糖蛋白升高^[9],与本研究结果相一致。由于糖化蛋白是反映测定前一段时间内血糖的总体水平,与血糖测定配合应用,便于更好地评价患者的糖代谢状况。又由于糖化蛋白与糖尿病血管合并症有正相关性,所以可用糖化蛋白指标估计血管合并症发生的危险度。

高尿酸血症、糖尿病、高脂血症、肥胖及高血压共同的发病基础是胰岛素抵抗^[10]。胰岛素能够促进肾脏对尿酸的重吸收,而使血尿酸升高,同时也促进了钠的重吸收,故还能引起水钠潴留以及血压升高。升高了的血尿酸可以激活肾素-血管紧张素系统,抑制一氧化氮合成酶1而引发动脉平滑肌增殖,导致升高血压。而胰岛素抵抗时,脂肪细胞代谢、脂蛋白代谢的有关酶活性、脂肪酸与葡萄糖代谢发生一系列异常,这可能是血清糖蛋白及丙酮酸升高的原因之一。

本研究表明,高尿酸可引起氨基酸代谢紊乱(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等支链氨基酸明显升高)。支链氨基酸是重要的能量来源,它有促进蛋白质生物合成、抑制蛋白质分解代谢的作用。最近研究表明,由18种氨基酸,包括酪氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸的摄入升高可改善老年患者舒张性血管内皮依赖性的一个独立的循环血管活性。并且这18种不同的氨基酸中,降低异亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的水平在改善葡萄糖耐量和减少心血管疾病的风险中是非常重要的^[11]。本研究中高尿酸大鼠血清丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等必须氨基酸含量增加可能与尿酸升高导致内皮功能紊乱及炎症因子的释放过多引起的氨基酸代谢紊乱所致,同时糖代谢紊乱的继发性改变^[12]。

本研究提示,升高的血清尿酸可使极低密度脂蛋白、不饱和脂肪酸、丙酮降低,导致脂代谢紊乱。极低密度脂蛋白(VLDL)残粒正常时大部分经肝低密度脂蛋白(LDL)受体识别,通过转化使得大部分的VLDL转变成LDL,进而使血清中的LDL浓度增加。LDL增多主要是由胆固醇增多并可伴有甘油三酯的增高和慢性肾功能衰竭(尿酸升高)及肝脏疾病等。高尿酸可以选择性地刺激在血管内皮炎症环境的发展,引起脂代谢紊乱,特定的不饱和饮食中的脂肪酸、亚油酸和丙酮释放随着脂代谢紊乱而发生变化。丙酮还可能与酵母膏所产生的急性毒性有关。同时高尿酸血症的尿酸盐结晶会损伤动脉内皮细胞^[13],并与嘌呤代谢和脂肪代谢的相互作用引起血管的炎性改变,因而高尿酸血症在血栓形成的缺血性疾病中起着明显的作用。它们可能是脂代谢异常疾病早期诊断和预后新的特异性代谢标志物群。

本研究结果显示,高尿酸血症大鼠血清甲醛分泌减少。甲酸主要是由色氨酸分解代谢生成,可用于嘌呤C2原子的合成,在核酸生物合成中起重要作用。本研究中高尿酸血症大鼠外周血甲酸浓度较药物干预前下降,这可能与高尿酸血症大鼠嘌呤核苷酸合成显著增强、甲酸被大量消耗有关^[14]。

4 结论

高尿酸血症动物模型代谢物主要表现在糖代谢与脂类代谢紊乱以及能量代谢中三羧酸循环(TCA)的失衡,代谢组学可为高尿酸血症客观化提供新的途径。

参考文献(References)

- [1] Erkmen U M, Sezer S, Bal Z, et al. Post-transplant Hyperuricemia as a cardiovascular risk factor[J]. Transplantation Proceedings, 2015, 47(4): 1146-1151.
- [2] Thomas M, Ian F, George N, et al. Protocol of the Febuxostat versus Allopurinol Streamlined Trial (FAST): A large prospective, randomised, open, blinded endpoint study comparing the cardiovascular safety of allopurinol and febuxostat in the management of symptomatic hyperuricaemia[J]. British Medical Journal of Open, 2014, 4(7): e005354.
- [3] Ciarla S, Struglia M, Giorgini P, et al. Serum uric acid levels and metabolic syndrome[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2014, 120(3): 119-122.
- [4] Odden M C, Amadu A R, Smit E, et al. Peralta CA uric acid levels, kidney function, and cardiovascular mortality in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1988-1994 and 1999-2002[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2014, 64(4): 550-557.
- [5] Hanna M H, Brophy P D. Metabolomics in pediatric nephrology: Emerging concepts[J]. Pediatric Nephrology, 2014, 30(6): 881-887.
- [6] Mussap M, Noto A, Fanos V, et al. Emerging biomarkers and metabolomics for assessing toxic nephropathy and acute kidney injury (AKI) in neonatology[J]. BioMed Research International, 2014, 60(25): 26-41.
- [7] Jayavelu N D, Bar N S. Metabolomic studies of human gastric cancer: Review[J]. World Journal of Gastroenterol, 2014, 20(25): 8092-8101.
- [8] Yuan G, Al shali K Z, Hegele R A, et al. Hypertriglyceridemia: Its etiology, effects and treatment, hypertriglyceridemia: Its etiology, effects and treatment[J]. Canadian Medical Association journal, 2007, 176(8):1113-1120.
- [9] 迪丽达尔·希甫甫, 赵平, 张向阳, 等. 酵母膏联合氧嗪酸钾构建高尿酸血症模型大鼠继发的心血管病变[J]. 中国工程与临床康复, 2012, 16(11): 1994-1998.
- [10] Dilidaer Sherip, Zhao Ping, Zhang Xiangyang, et al. Development of secondary cardiovascular disease in hyperuricemia model rats induced by yeast extract combined with oteracil potassium[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 16(11): 1994-1998.
- [11] Jin Y L, Zhu T, Xu L, et al. Uric acid levels, even in the normal range, are associated with increased cardiovascular risk: The Guangzhou biobank cohort study[J]. International Journal of Cardiology, 2013, 168(3): 2238-2241.
- [12] Bain J R. Targeted metabolomics finds its mark in diabetes research[J]. Diabetes, 2013, 62(2): 349-351.
- [13] Hu M, Tomlinson B. Current perspectives on rosuvastatin[J]. Journal of Integrated Blood Pressure Control, 2013, 18(6): 15-25.
- [14] 徐秋莲, 杜简秋, 刘淑杰, 等. 阿托伐他汀钙对慢性充血性心力衰竭患者血浆内皮素及血清尿酸水平的影响[J]. 中国老年医学杂志, 2005, 7(25): 845-846.
- Xu Qiulian, Du Jianqiu, Liu Shujie, et al. Effect of atorvastatin calcium on the levels of plasma endothelin and serum uric acid in patients with chronic heart failure[J]. Chinese Journal of geriatric medicine, 2005, 7(25): 845-846.
- [14] Strippoli G F, Navaneethan S D, Johnson D W, et al. Effects of statins in patients with chronic kidney disease: Meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials[J]. British Medical Journal, 2008, 236(7645): 645-651.

(责任编辑 吴晓丽)