

羟基红花黄色素 A 对动脉粥样硬化早期脂肪酸的调控研究

魏紫奕^{1,2}, 徐文娟^{2,3}, 董姣姣^{1,2}, 刘洁^{2,4}, 贾志鑫^{2,4}, 陈奕君^{1,2},
王明霞^{1,2}, 阳娇^{1,2}, 肖红斌^{2,4*}

(北京中医药大学 1. 中药学院, 2. 中药分析与转化研究中心, 3. 生命科学学院, 4. 北京中医药研究院, 北京 100029)

摘要: 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种严重危害人类健康的复杂代谢紊乱综合征, 其发生发展与游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 代谢轮廓改变直接相关。本文采用氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的泡沫化巨噬细胞作为动脉粥样硬化的早期模型, 采用靶向代谢组学方法研究游离脂肪酸的代谢轮廓变化以及羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 的调控作用。通过动态多反应监测模式 (dynamic MRM) 在 20 min 内实现细胞内 27 种脂肪酸的定量分析, 明确 27 种脂肪酸的含量分布。结合模式识别筛选出 13 个巨噬细胞泡沫化生物标志物, 其中在巨噬细胞泡沫化过程中饱和脂肪酸总量升高, 而十二碳酸、十四碳酸、十八碳烯酸及单不饱和脂肪酸总量降低, 羟基红花黄色素 A 对十二碳酸、十四碳酸和十八碳烯酸异常代谢具有回调作用, 网络分析表明与之相关的通路为脂肪酸生物合成通路 (*de novo* fatty acid biosynthesis), oleoyl-(acyl-carrier-protein) hydrolase (OLAH) 可能是羟基红花黄色素 A 调控脂肪酸代谢的潜在靶点。

关键词: 代谢组学; 游离脂肪酸; 巨噬细胞泡沫化; 动脉粥样硬化; 羟基红花黄色素 A; 脂肪酸生物合成
中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 10-1680-09

Hydroxysafflor yellow A repairing the metabolic disturbances of early atherosclerosis based on fatty acid profiling

WEI Zi-yi^{1,2}, XU Wen-juan^{2,3}, DONG Jiao-jiao^{1,2}, LIU Jie^{2,4}, JIA Zhi-xin^{2,4},
CHEN Yi-jun^{1,2}, WANG Ming-xia^{1,2}, YANG Jiao^{1,2}, XIAO Hong-bin^{2,4*}

(1. School of Chinese Materia Medica, 2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, 3. School of Life Science, 4. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Atherosclerosis (AS) is a complex metabolic syndrome that seriously harms human health, and its occurrence and development are directly related to the metabolic disturbances of free fatty acids (FFA). In this study, macrophage-derived foam cells were established as the model of early AS. Therefore, the metabolic disturbances of FFA in ox-LDL induced foamy macrophages were analyzed using target metabolomics. Then the effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on regulating FFA was also explored. The quantitative analysis of 27 fatty acids was obtained within 20 min based on dynamic MRM mode. Thirteen metabolic biomarkers of macrophage-derived foam cells were identified using multivariate statistical analysis. It was found that upregulation of total SFA and downregulation of C12:0, C14:0, C18:1, total MUFA were the typical metabolic features in macrophage-derived foam cells. Furthermore, HSYA displayed obvious repairing effect on C12:0, C14:0 and C18:1, which were involved in *de novo* fatty acid biosynthesis pathway. Oleoyl-(acyl-carrier-protein)

收稿日期: 2018-06-03; 修回日期: 2018-07-31.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81703947).

*通讯作者 Tel: 86-10-64286490, E-mail: hbxiao69@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0409

hydrolase (OLAH), as the key enzyme in *de novo* fatty acid biosynthesis pathway, may be a drug target of HSYA.

Key words: metabolomics; free fatty acid; macrophage-derived foam cell; atherosclerosis; hydroxysafflor yellow A; *de novo* fatty acid biosynthesis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种严重危害人类健康的复杂代谢紊乱综合征, 是众多缺血性心脑血管疾病的重要生理病理基础^[1]。在动脉粥样硬化众多发病机制中, 游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 是动脉粥样硬化危险因素之一, 作为重要的能源物质和信号传导分子, 脂肪酸参与动脉粥样硬化的发生发展过程, 对调节生物体生理功能起着重要作用^[2]。研究发现, 十六碳酸能够通过刺激 C 反应蛋白 (CRP)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达促进血管平滑肌炎性反应进而参与动脉粥样硬化的形成^[3]。十八碳烯酸通过改善炎症信号对内皮功能的影响来减少血管平滑肌的增值和凋亡, 有助于改善动脉粥样硬化进程和斑块稳定性^[4]。十八碳二烯酸和二十碳五烯酸可以有效减少胆固醇的积累, 是抗动脉粥样硬化的保护剂^[5], 因此脂肪酸代谢轮廓变化与动脉粥样硬化发病密切相关。

巨噬细胞脂质化后形成泡沫细胞是动脉粥样硬化发生的始动因素, 巨噬细胞中的脂滴摄取氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 促进脂质负载形成泡沫细胞, 进而胆固醇酯水解为游离胆固醇和游离脂肪酸^[6]。课题组^[7]前期研究发现二十碳四烯酸代谢产物花生四烯酸乙醇胺 (AEA) 过度积累是巨噬细胞泡沫化的关键代谢特征, 巨噬细胞泡沫化过程机体的代谢紊乱涉及到脂肪酸相关代谢通路, 然而系统脂肪酸异常代谢与泡沫细胞之间的关系目前尚不清楚。因此基于氧化低密度脂蛋白诱导巨噬细胞泡沫化模型, 深入研究动脉粥样硬化早期脂肪酸代谢特征, 无论是筛选疾病早期代谢标志物, 全面预防疾病发生发展, 还是从分子水平揭示药物作用机制都是非常必要且有意义的。

活血化瘀中药在动脉粥样硬化的防治中发挥着显著的疗效^[8], 羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 是中药红花主要的活性成分, 能够通过抑制氧化低密度脂蛋白摄取来减少细胞内胆固醇酯沉积从而抑制巨噬细胞的泡沫化进而发挥抗早期动脉粥样硬化的作用^[9], 然而羟基红花黄色素 A 对动脉粥样硬化疾病状态下脂肪酸代谢异常的调控规律尚不清楚。代谢组学能够即时、灵敏、真实反映在各种外界因素刺激下生物体整体功能状态的应答与

调节, 靶向代谢组学能够有针对性地对疾病特征代谢物开展系统研究, 加强定量的准确性, 有助于更深入理解病变和治疗过程机体内物质的代谢状况。因此本文以氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞泡沫化为动脉粥样硬化的早期模型, 系统考察脂肪酸异常代谢及羟基红花黄色素 A 的调控作用, 揭示羟基红花黄色素 A 治疗动脉粥样硬化的作用机制和筛选药物潜在的作用靶点, 为动脉粥样硬化临床诊断以及新药研发提供借鉴和参考。

材料与方法

试剂 羟基红花黄色素 A (Q-008-170303) 购于中国成都瑞芬思生物科技有限公司; 脂肪酸对照品均购买自美国 Nu-Chek 公司: 十二碳酸 (dodecanoic acid, C12:0)、十六碳酸 (palmitic acid, C16:0)、十四碳酸 (tetradecanoic acid, C14:0)、十四碳烯酸 (myristoleic acid, C14:1)、十六碳烯酸 (palmitoleic acid, C16:1)、十七碳酸 (heptadecanoic acid, C17:0)、十七碳烯酸 (heptadecenoic acid, C17:1)、十八碳酸 (stearic acid, C18:0)、十八碳烯酸 (9Z-octadecenoic acid, C18:1)、十八碳二烯酸 (linoleic acid, C18:2)、 α -十八碳三烯酸 (α -linolenic acid, α -C18:3)、 γ -十八碳三烯酸 (γ -linolenic acid, γ -C18:3)、十九碳酸 (nonadecanoic acid, C19:0)、十九碳烯酸 (nonadecenoic acid, C19:1)、二十碳酸 (arachidate, C20:0)、二十碳烯酸 (eicosenoic acid, C20:1)、二十碳二烯酸 (eicosadienoic acid, C20:2)、二十碳三烯酸 (eicosatrienoic acid, C20:3)、二十碳四烯酸 (arachidonic acid, C20:4)、二十碳五烯酸 (timnodonate, C20:5)、二十二碳烯酸 (erucic acid, C22:1)、二十二碳三烯酸 (docosatrienoic acid, C22:3)、二十二碳四烯酸 (docosatetraenoic acid, C22:4)、二十二碳六烯酸 (dacosahexaenoic acid, C22:6)、二十四碳烯酸 (tetracosenic acid, C24:1), 上述对照品纯度均大于 98%; RAW 264.7 细胞株 (国家实验细胞资源共享平台); DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司); 噻唑兰 (MTT, 北京索莱宝科技有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 法国 Sigma-Aldrich 公司); 总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 检测试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); 氧化低密度脂蛋白

(广州奕源生物科技有限公司); 无水乙醇、甲醇、甲基叔丁基醚 (MTBE)、甲酸和乙腈均为色谱纯 (美国 Fisher Chemical 公司); 超纯水 (美国 Millipore 公司)。

仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪和 Agilent 6470 三重四级杆串联质谱仪 (美国 Agilent 公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); IX71 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 3-18KS 离心机 (德国 Sigma 公司); Bead Ruptor 24 珠式样品研磨器 (美国 OMNI 公司); Concentrator plus 真空浓缩机 (德国 Eppendorf 公司)。

细胞培养及实验分组 RAW 264.7 细胞贴壁生长, 培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的孵育箱中培养, 0.25% 胰酶消化传代, 选取对数生长期细胞进行实验。实验分为空白组、模型组和羟基红花黄色素 A 药物干预组 3 个组别, 每组平行 6 个样品。空白组不加氧化低密度脂蛋白和羟基红花黄色素 A, 模型组采用 100 μg·mL⁻¹ 氧化低密度脂蛋白培养细胞 24 h, 羟基红花黄色素 A 组采用 40 μg·mL⁻¹ 羟基红花黄色素 A 预先处理 1 h 后继续用 100 μg·mL⁻¹ 氧化低密度脂蛋白培养细胞 24 h。羟基红花黄色素 A 用超纯水配制成 10 mg·mL⁻¹ 母液, 实验中用 DMEM 完全培养基稀释成 40 μg·mL⁻¹ 加入细胞中^[9]。

巨噬细胞泡沫化模型评价 MTT 法检测细胞活力: 将 RAW 264.7 细胞按每孔 1×10⁴ 个接种于 96 孔板中, 每孔加培养基 200 μL, 实验分组及药物处理同前。吸弃细胞培养液, 向各孔细胞加入 MTT (0.5 mg·mL⁻¹) 200 μL 避光培养 4 h, 吸弃培养基, 加入 DMSO 溶液 150 μL, 室温振荡 1 min, 用酶标仪测定 490 nm 波长吸光度。细胞存活率 = 各组细胞吸光度值 / 空白组细胞吸光度值 × 100%。

测定胆固醇酯/总胆固醇 (CE/TC) 值: 按照总胆固醇和游离胆固醇试剂盒操作说明书, 测定细胞内 CE/TC 值。CE/TC = (TC - FC) / TC。

细胞收集及细胞内代谢物提取 将 RAW 264.7 细胞按每孔 2×10⁶ 个接种于 60 mm 的细胞培养皿中, 每个培养皿加培养基 2 mL, 实验分组及药物处理同前, 吸弃细胞培养液, 用 PBS 清洗 3 遍, 加入冷甲醇 1 mL 淬灭细胞, 然后加入 PBS 2 mL, 采用细胞刮顺着同一方向轻轻的刮取培养皿底部, 将细胞悬液 4 °C 下离心 (1 000 r·min⁻¹、10 min) 获得细胞饼, PBS 吹散, 离心, 重复淋洗两遍, 收集细胞饼于 5 mL EP 管中。以上过程均采用冰上操作^[10]。

采用甲基叔丁基醚-甲醇-水 (MTBE) 体系进行细胞代谢物提取^[11]。首先加入 75% 甲醇 400 μL 并用样品研磨均质匀浆机破碎细胞 (S: 5、T: 20 s、D: 20 s、C: 3), 随即加入 MTBE 1 mL 振摇 30 min, 然后加入水 250 μL 室温下静置分层 10 min, 4 °C 下离心 (14 000 r·min⁻¹、15 min), 收集上清液, 然后进行真空浓缩, 并用 80% 甲醇 150 μL 复溶。

测定细胞内游离脂肪酸工作液的配制 分别精密称定 27 种游离脂肪酸对照品, 用无水乙醇配制成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 储备液, 再按照 1 : 2.5 : 2 : 2 : 2.5 : 10 : 2 比例逐步稀释混合对照品溶液。其中 C18:0、C14:0 浓度稀释为 10、4、2、1、0.4、0.04、0.02 μg·mL⁻¹; α-C18:3、γ-C18:3、C12:0、C15:0、C16:1、C17:0、C18:2、C20:4、C20:0、C14:1、C17:1、C20:1、C22:1 浓度稀释为 2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.01、0.005 μg·mL⁻¹; C20:5、C20:3、C22:3、C19:0、C22:2、C24:1、C19:1 浓度稀释为 0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.002、0.001 μg·mL⁻¹; C20:2、C22:4、C22:6 浓度稀释为 0.25、0.1、0.05、0.025、0.01、0.001、0.0005 μg·mL⁻¹; C18:1 浓度稀释为 5、2、1、0.5、0.2、0.02、0.01 μg·mL⁻¹; C16:0 浓度稀释为 20、8、4、2、0.8、0.08、0.04 μg·mL⁻¹。

测定细胞内游离脂肪酸的液相-质谱条件 ZORBAX Eclipse Plus C8 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温 45 °C; 流动相: A 相为 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-水, B 相为乙腈; 梯度条件: A 相起始为 45%, 保持 0.5 min, 20 min 升至 90%, 保持 2 min; 流速为 0.5 mL·min⁻¹; 进样量 1 μL; 质谱分析采用负离子模式, 离子源: AJS ESI; 动态多反应监测模式, 离子对优化及碎裂电压结果列于表 1; 干燥气温度 350 °C; 干燥气流速 9 L·min⁻¹; 鞘气温度 250 °C; 鞘气流速 11 L·min⁻¹。

统计学分析 采用 MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) 在线工具对脂肪酸含量原始数据进行归一化处理, 采用 SIMCA-P 12.0 软件进行 PCA 和 PLS-DA 模式识别分析, Origin 8.0 软件绘制柱形图和箱形图, Cytoscape 软件进行代谢网络分析。

结果

1 羟基红花黄色素 A 对巨噬细胞泡沫化损伤调控作用

参照文献^[9]设置 40 μg·mL⁻¹ 为羟基红花黄色素 A 的作用剂量, 首先采用 MTT 法测定羟基红花黄色素 A (40 μg·mL⁻¹) 药物干预下的细胞存活率为 95%, 表明 40 μg·mL⁻¹ 是羟基红花黄色素 A 的安全剂量;

Table 1 The dynamic multiple reaction monitoring mass spectrometry parameters of free fatty acids (FFA)

Compound	Formula	t_R /min	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor/V	Collision energy/V
C12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1.97	199.3	199.3	105	5
C14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	3.55	227.4	227.4	150	5
C14:1	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	2.43	225.4	225.4	135	5
C15:0	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	4.95	241.4	241.4	105	5
C16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6.57	255.4	255.4	165	5
C16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	4.6	253.4	253.4	135	5
C17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	8.4	269.4	269.4	135	5
C17:1	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	6.05	267.4	267.4	150	5
C18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	10.13	283.5	283.5	165	5
C18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	7.63	281.5	281.5	165	5
C18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5.76	279.5	279.5	150	5
γ -C18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	4.33	277.5	277.5	135	5
α -C18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	4.06	277.5	277.5	135	5
C19:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	12.17	297.5	297.5	165	5
C19:1	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	9.84	295.5	295.5	180	5
C20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	14.17	311.5	311.5	165	5
C20:1	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	11.66	309.5	309.5	165	5
C20:2	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	8.92	307.5	307.5	165	5
C20:3	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	7.04	305.5	305.5	165	5
C20:4	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	5.52	303.5	303.5	135	5
C20:5	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	4.02	301.5	301.5	135	5
C22:1	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	15.08	337.6	337.6	135	5
C22:2	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	12.46	335.6	335.6	165	5
C22:3	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	10.34	333.6	333.6	180	5
C22:4	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	8.54	331.6	331.6	150	5
C24:1	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	18.77	365.6	365.6	180	5
C22:6	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	16.15	325.6	325.6	135	5

CE/TC 值是巨噬细胞泡沫化的评价指标, 巨噬细胞经过氧化低密度脂蛋白诱导形成泡沫细胞, 进而引起胆固醇酯含量升高, 通过测定 CE/TC 值评价羟基红花黄色素 A 对巨噬细胞泡沫化损伤的调控作用 (正常细胞 CE/TC < 50%)^[12]。CE/TC 值测定结果如表 2 所示, 与空白组相比, 模型组 CE/TC 值为 63% ($P < 0.01$), 表明早期动脉粥样硬化模型建立成功; 与模型组相比, 羟基红花黄色素 A 药物干预后 CE/TC 值为 0.38% ($P < 0.01$), 表明羟基红花黄色素 A 对巨噬细胞泡沫化有调控作用。

Table 2 The relative value of cholesteryl ester of different cell groups. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group. HSYA: Hydroxy safflor yellow A

Cholesteryl ester	Control	Model	HSYA
CE/TC	0.41 ± 0.02	0.63 ± 0.03**	0.38 ± 0.07 $\Delta\Delta$

2 细胞游离脂肪酸含量测定

2.1 HPLC-QQQ/MS 分析方法的建立

为了改善峰型和分离度, 实验优化了流动相、流

动相梯度、色谱柱温度、流速等液相条件; 对于质谱条件优化, 采用动态多反应监测扫描模式, 该模式根据各个脂肪酸离子对的质荷比进行定量, 能够提高检测灵敏度和定量准确性。根据检测的目标化合物, 首先确定了在负离子模式下脂肪酸质谱响应较好, 然后对相应母离子 (precursor ion)、碎裂电压 (fragmentor)、子离子 (product ion) 及碰撞能量 (collision energy) 进行优化, 最终建立针对于每个化合物的多反应监测方法, 从而实现对各化合物选择性检测。为了实现各化合物的最大离子化, 同时优化了干燥气温度、干燥气流速、鞘气温度、鞘气流速等离子源参数。图 1 为各个游离脂肪酸提取的动态多反应监测的叠加图, 在 20 min 内实现了 27 种脂肪酸的分离和定量分析。脂肪酸出峰顺序与其结构 (链长和不饱和度) 相关, 对于饱和脂肪酸, 碳链越长, 保留时间越大; 对于不饱和脂肪酸, 相同碳链数, 不饱和键越多, 保留时间越小。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围和定量限 本实验所测游离脂肪酸

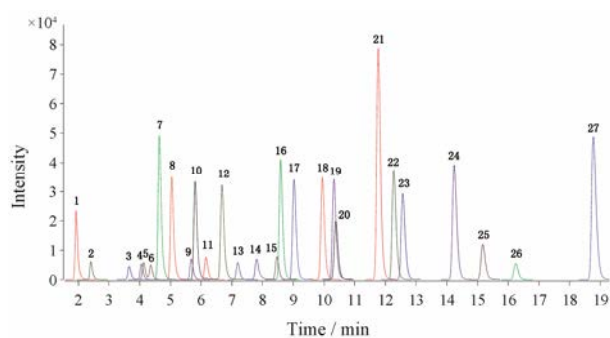


Figure 1 Dynamic MRM chromatogram of 27 FFAs. Peak order: 1. C12:0; 2. C14:1; 3. C14:0; 4. C20:5; 5. α -C18:3; 6. γ -C18:3; 7. C16:1; 8. C15:0; 9. C20:4; 10. C18:2; 11. C17:1; 12. C16:0; 13. C20:3; 14. C18:1; 15. C17:0; 16. C22:4; 17. C20:2; 18. C19:1; 19. C18:0; 20. C22:3; 21. C20:1; 22. C19:0; 23. C22:2; 24. C20:0; 25. C22:1; 26. C22:6; 27. C24:1

均为内源性组分, 结合脂肪酸的溶解性, 采用无水乙醇作为溶剂, 配制对照品溶液。定量限 (LOQ) 是信噪比为 10 时脂肪酸的浓度, 线性范围 (linear range) 最低浓度为各脂肪酸的定量限。按照所建立 HPLC-QQQ/MS 分析方法分析, 然后以目标测定的 27 种脂肪酸对照品峰面积为纵坐标 y , 浓度为横坐标 x , 绘

制标准曲线方程并得到相关系数 (R^2)。结果表明目标测定脂肪酸的峰面积与浓度线性关系良好, 相关系数 R^2 值均高于 0.995 5, 线性范围和定量限见表 3。

2.2.2 精密度 取中等浓度的脂肪酸混合标准溶液, 日内精密度的脂肪酸对照品连续进样 6 次, 日间精密度的脂肪酸对照品连续 3 天进样, 根据峰面积测得浓度并计算 RSD 值。结果日内精密度 RSD 均值 1.64%, 日间精密度 RSD 均值 8.99%, 表明仪器精密度良好, 满足样品测定的要求。

2.2.3 稳定性 本实验考察了细胞样品处理后 24 h 内 4 °C 放置的稳定性, 取同一时间点细胞样品, 分别于 0、12 和 24 h 进样分析, 根据峰面积测得浓度并计算 RSD 值, 结果样品稳定性 RSD 均值 4.01%, 表明样品在 24 h 内 4 °C 放置稳定。

2.2.4 回收率 待测游离脂肪酸为内源性物质, 本实验按中浓度加入脂肪酸混合标准溶液 (中浓度水平约为样品含量的 0.5~1.5 倍) 进样分析, 根据峰面积测得浓度并计算回收率。结果各脂肪酸回收率均值 113.48%, RSD 均值 5.6%, 表明该方法可用于细胞中

Table 3 Liner regression equation and limit of quantitation (LOQ) of 27 FFAs

FFA	Regression equation	R^2	Linear range/ng·mL ⁻¹	LOQ/ng·mL ⁻¹
C12:0	$y = 15.9104x + 888.8935$	0.9992	5–2500	5
C14:0	$y = 20.0417x + 1536.5274$	0.9998	20–10000	20
C14:1	$y = 30.8671x + 783.5496$	0.9997	5–2500	5
C15:0	$y = 30.2300x + 959.5059$	0.9996	5–2500	5
C16:0	$y = 19.8883x + 4323.7660$	0.9998	40–20000	40
C16:1	$y = 47.2660x + 1268.4549$	0.9998	5–2500	5
C17:0	$y = 37.3832x + 461.4565$	0.9998	5–2500	5
C17:1	$y = 35.1793x + 680.1765$	0.9999	5–2500	5
C18:0	$y = 24.9293x + 9560.8119$	0.9955	20–10000	20
C18:1	$y = 46.1929x + 1471.9804$	0.9998	10–5000	10
C18:2	$y = 44.9046x + 1371.9923$	0.9997	5–2500	5
γ -C18:3	$y = 54.8647x + 1135.2451$	0.9998	5–2500	5
α -C18:3	$y = 64.8647x + 1135.2451$	0.9998	5–2500	5
C19:0	$y = 33.8196x + 228.6873$	0.9993	1–500	1
C19:1	$y = 31.3812x + 128.7397$	0.9991	1–500	1
C20:0	$y = 28.9957x + 637.6407$	0.9998	5–2500	5
C20:1	$y = 67.0729x + 603.9144$	0.9997	5–2500	5
C20:2	$y = 63.3940x + 189.3937$	0.9995	0.5–250	0.5
C20:3	$y = 44.1930x + 81.8747$	0.9998	1–500	1
C20:4	$y = 56.1303x + 273.6084$	0.9998	5–2500	5
C20:5	$y = 45.3013x + 110.9045$	0.9999	1–500	1
C22:1	$y = 55.6134x + 540.4880$	0.9999	5–2500	5
C22:2	$y = 32.6144x + 308.4928$	0.9985	1–500	1
C22:3	$y = 37.1717x - 0.0288$	0.9997	1–500	1
C22:4	$y = 36.2826x + 37.7447$	0.9999	0.5–250	0.5
C24:1	$y = 37.6167x + 211.1842$	0.9996	1–500	1
C22:6	$y = 463.7641x + 856.7756$	0.9998	0.5–250	0.5

脂肪酸测定要求。

2.3 细胞游离脂肪酸含量测定

按照所建立 HPLC-QQQ/MS 分析方法, 同时检测不同浓度脂肪酸对照品和细胞样品, 将采集的数据导入安捷伦定量分析软件计算空白组、模型组和羟基红花黄色素 A 药物干预组细胞中脂肪酸含量, 同时统计了饱和脂肪酸 (saturated fatty acid, SFA)、单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid, MUFA) 和多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 的总含量 (图 2)。结果表明 C16:0 和 C18:0 是主要的饱和脂肪酸, C18:1 是主要的单不饱和脂肪酸, 同时 C18:2 是主要的多不饱和脂肪酸, 这些脂肪酸含量变化主要影响饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和

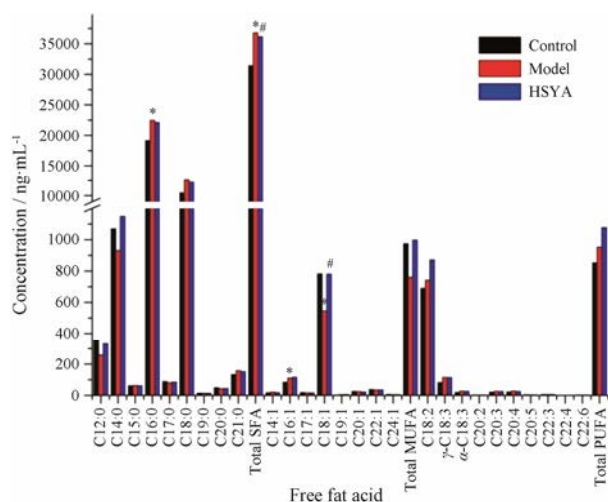


Figure 2 Concentrations of 27 free fatty acids of different cell groups. SFA: Saturated fatty acid; MUFA: Monounsaturated fatty acid; PUFA: Polyunsaturated fatty acid. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

脂肪酸总含量的变化。

3 细胞游离脂肪酸数据处理与分析

3.1 细胞游离脂肪酸主成分分析

根据细胞中游离脂肪酸含量结果, 采用代谢组学数据处理方法, 考察不同组内脂肪酸的分布规律。首先采用 MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) 在线工具设置归一化参数“Normalization by sum、Log transformation、Mean centering”以减小极大极小值对整体数据的影响^[13]。将归一化的数据导入 SIMCA-P 软件进行多元统计分析^[14], 以各样本所测得脂肪酸的含量为统计变量, 对各组进行无监督的 PCA 分析, 通过散点图对样本进行整体评价, 其中空白组和模型组可明显区分 ($R^2X=0.646$, $Q^2=0.435$) (图 3A), 表明巨噬细胞泡沫化后细胞内脂肪酸含量发生了变化; 空白组、模型组和羟基红花黄色素 A 组可相互分开, 且羟基红花黄色素 A 组位于空白组和模型组之间 ($R^2X=0.634$, $Q^2=0.424$) (图 3B), 表明给予羟基红花黄色素 A 后细胞中的脂肪酸水平发生了变化。

3.2 巨噬细胞泡沫化生物标志物筛选

为了筛选巨噬细胞泡沫化生物标志物, 首先对空白组和模型组进一步建立有监督的 PLS-DA 模型来增强对分类贡献大的变量的识别 (图 3C), PLS-DA 模型中 VIP 值 (variable importance of projection) 可以用来衡量变量对于分组的贡献, VIP 值越大对差异的贡献越大, 其中 VIP 值 > 1.0 可作为区分健康与泡沫化巨噬细胞的潜在生物标志物, 基于此筛选确定了 C12:0, C14:0, C17:0, C17:1, C18:1, C19:0, C20:0, C20:1, C20:5, C22:1, C22:3, Total MUFA 和 Total SFA 13 个巨噬细胞泡沫化潜在生物标志物 (表 4)。在上

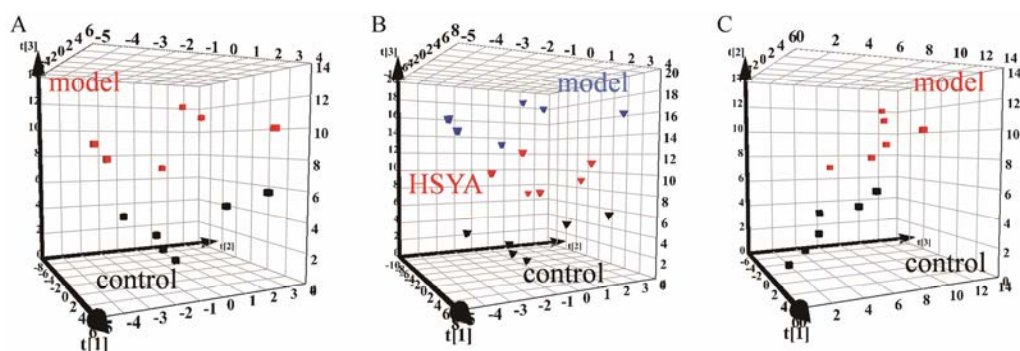


Figure 3 The pattern recognition result of different cell groups. A: PCA plot between control and model; B: PCA plot between control, model and HSYA; C: PLS-DA plot between control and model

Table 4 Potential biomarkers of macrophage-derived foam cells (VIP > 1). VIP: Variable importance of projection

FFA	C12:0	C14:0	C17:0	C17:1	C18:1	C19:0	C20:0	C20:1	C20:5	C22:1	C22:3	Total MUFA	Total SFA
VIP	1.58	1.18	1.64	1.38	1.36	1.22	1.44	1.04	1.11	1.37	1.12	1.42	1.04

述标志物中饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸占主要部分, 表明巨噬细胞泡沫化扰乱细胞内脂肪酸正常代谢以饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸为主。

3.3 巨噬细胞泡沫化代谢网络分析

根据 3.2 筛选的特征标志物, 应用 Cytoscape 软件中的 Metscape 插件通过构建巨噬细胞泡沫化特征标志物化合物-反应-酶-基因的代谢网络深入了解特征标志物信息^[15]。图 4 所示, 在代谢网络中六边形表示相关代谢物, 菱形表示相关反应, 方形表示相关酶, 圆形表示相关基因, 红色表示本实验巨噬细胞泡沫化的特征标志物。通路富集分析结果表明脂肪酸生物合成通路 (*de novo* fatty acid biosynthesis), 二十碳五烯酸抗炎代谢物合成通路 (putative anti-inflammatory metabolites formation from EPA) 和多不饱和脂肪酸代谢通路 (Ω 3 fatty acid metabolism) 与疾病有重要相关性。图 4 结果表明 3 个特征标志物 C12:0、C14:0 和 C18:1 均富集到脂肪酸生物合成通路, 提示

脂肪酸生物合成通路在疾病发生发展过程中发挥重要作用, 也是药物调控规律研究的主要切入点。

3.4 羟基红花黄色素 A 对巨噬细胞泡沫化脂肪酸异常代谢的调控作用及代谢网络分析

通过脂肪酸标志物的筛选明确了巨噬细胞泡沫化过程代谢紊乱, 以此为基础进一步考察羟基红花黄色素 A 的调控方式和作用机制。首先分析 13 个特征标志物在 3 组样本中的含量分布情况 (图 5), 结果表明与空白组相比, C12:0、C14:0、C17:0、C17:1、C18:1、C19:0、C20:0、C22:1、C22:3、Total MUFA 含量降低, 而 Total SFA 含量升高; 通过羟基红花黄色素 A 药物干预后, 与模型组比较羟基红花黄色素 A 对 C12:0、C14:0、C17:1、C18:1、C22:1、C22:3、Total MUFA、Total SFA 有调控作用。值得注意的是, 羟基红花黄色素 A 能够有效改善脂肪酸生物合成通路上的 3 个特征脂肪酸 (C12:0、C14:0 和 C18:1) 的异常代谢, 表明羟基红花黄色素 A 通过调控这 3 个特征

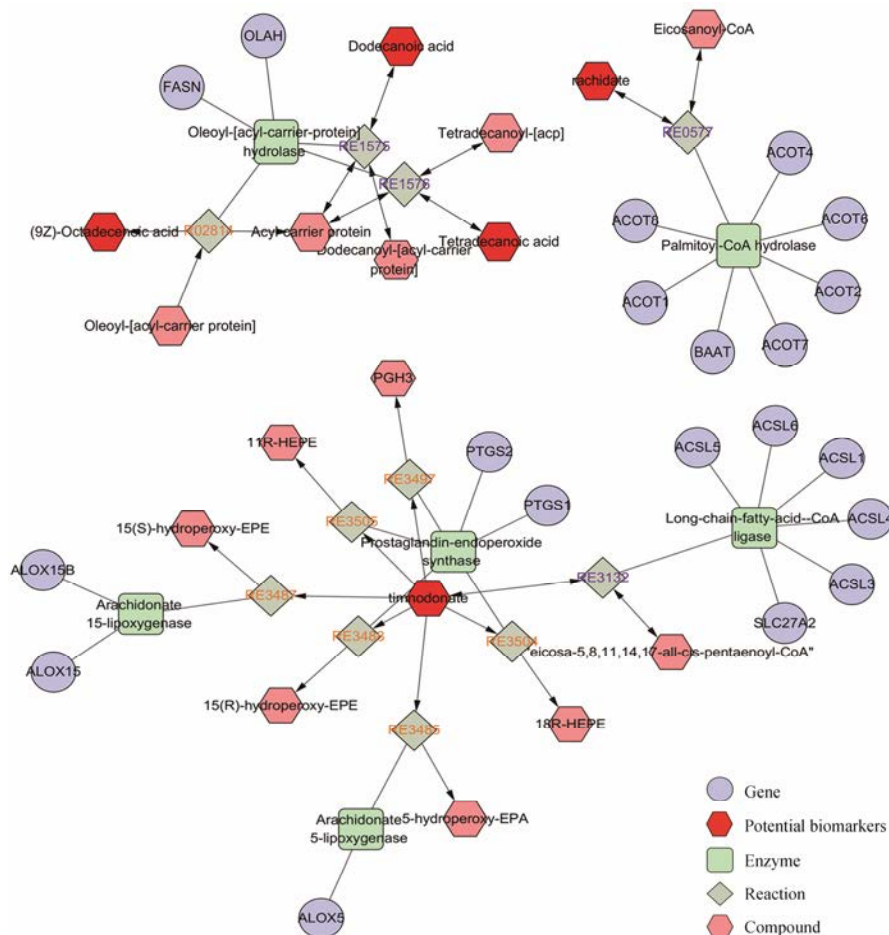


Figure 4 Network result of macrophage-derived foam cells (Compound-Reaction-Enzyme-Gene). ALOX5: Arachidonate 5-lipoxygenase; ALOX15: Arachidonate 15-lipoxygenase; OLAH: Oleoyl-(acyl-carrier-protein) hydrolase; PTGS2: Prostaglandin-endoperoxide synthase; ACOT2: Acyl-coenzyme A thioesterase 2; BAAT: Bile acid-CoA; Acs11: Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1

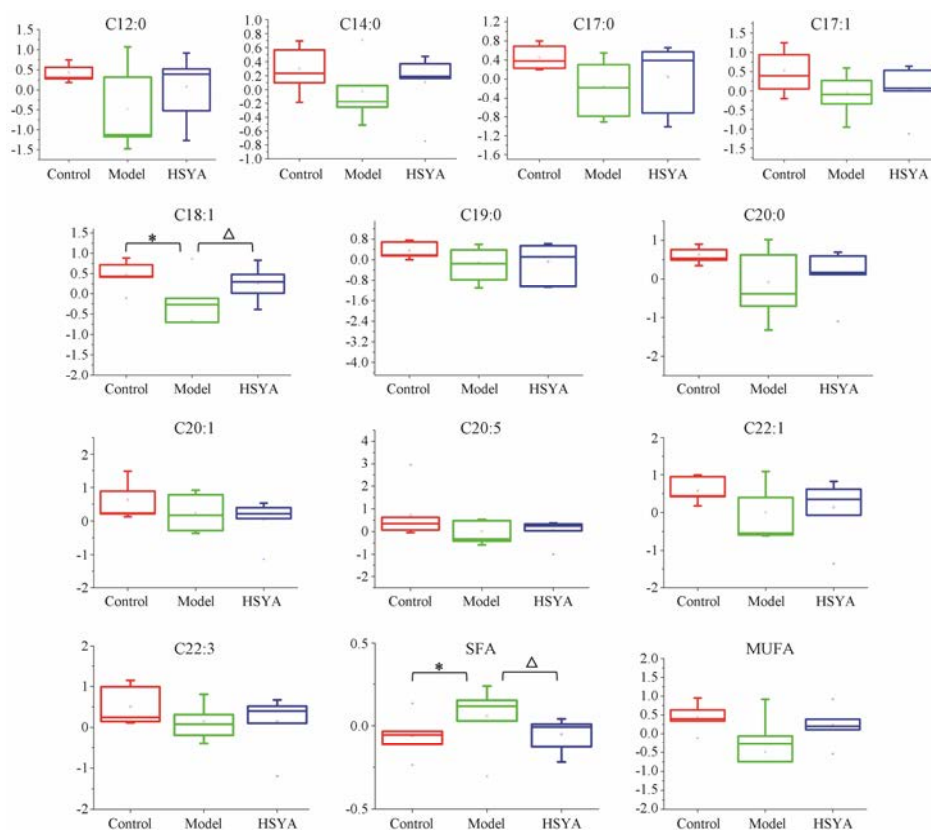


Figure 5 Content of characteristics bio-markers intervened by HSYA. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

代谢物进而影响脂肪酸生物合成通路。

讨论

系统认识疾病代谢异常情况是研究药物作用机制的前提与基础, 本文以游离脂肪酸为研究对象开展靶向代谢组学研究, 筛选了动脉粥样硬化早期的 13 个特征标志物, 进而发现羟基红花黄色素 A 能够通过有效调节 Total SFA, C14:0 和 C18:1 等特征标志物和影响脂肪酸生物合成通路来改善动脉粥样硬化异常代谢状况, 该工作对于深入认识动脉粥样硬化早期脂肪酸代谢状况, 发现特效药物具有重要的意义。

本文在筛选的疾病标志物中发现羟基红花黄色素 A 对 Total SFA 和 C18:1 这两个标志物作用显著, 结合相关文献对 Total SFA 和 C18:1 在动脉粥样硬化早期的作用情况进行探讨。SFA 是一类碳链中不含双键的脂肪酸, 临床研究发现, 与健康人群相比动脉粥样硬化患者中饱和脂肪酸浓度增加, 同时发现肿瘤坏死因子、白介素-6 (IL-6) 和白介素-8 (IL-8) 浓度也增多^[16], IL-6、IL-8 等炎性细胞因子能够参与动脉粥样硬化的炎症反应, 炎症反应在动脉粥样硬化斑块形成、进展和继发病变中均发挥重要作用^[17], 因此 SFA 的增多可促进动脉粥样硬化。此外, 体内过量的

SFA 能够被 Toll 样受体 4 (TLR4) 识别, 并引起炎症转录因子的表达 [如核因子 κ B (NF- κ B)、环氧酶 (COX2) 等]^[18], 促进单核细胞黏附和激活炎症反应。本实验在巨噬细胞泡沫化过程中 SFA 浓度升高, 进而促进动脉粥样硬化炎症反应, 经羟基红花黄色素 A 给药后细胞中 SFA 浓度降低 (图 5), 推测羟基红花黄色素 A 通过减轻机体炎性反应从而发挥对动脉粥样硬化的治疗作用; C18:1 是脂肪酸中的主要成分约占血液中脂肪酸含量的 40%^[19]。有报道, 人体内 C18:1 含量异常升高与非酒精性脂肪肝和动脉粥样硬化这两种代谢综合征发展有关^[20], C18:1 对心血管水平有有益的影响, 通过抑制 JNK-1/2 和 NF- κ B 通路, 减少血管平滑肌细胞 (VSMCs) 的增殖和凋亡可能有助于改善动脉粥样硬化的过程及其稳定性^[4]。羟基红花黄色素 A 治疗后细胞中 C18:1 水平上调 (图 5), 推测羟基红花黄色素 A 发挥对动脉粥样硬化治疗作用可能与减轻炎症反应有关。

基于疾病标志物构建代谢网络能够追踪代谢物和蛋白间的连接, 有助于从整体层面上认识疾病的本质。根据 3.4 结果, 脂肪酸生物合成通路在动脉粥样硬化发挥重要作用, oleoyl-(acyl-carrier-protein) hydrolase (OLAH) 是脂肪酸生物合成通路上的关键

酶, OLAH 参与脂肪酸生物合成过程和脂质生物合成过程^[21], 能够改善 C12:0、C14:0 和 C18:1 代谢异常 (图 4), 由此表明羟基红花黄色素 A 可能通过调控 OLAH 表达影响脂肪酸代谢异常从而改善动脉粥样硬化, 推测 OLAH 可能是羟基红花黄色素 A 治疗动脉粥样硬化的潜在作用靶点, 相关作用机制后续将进行深入研究。

综上所述, 本研究以巨噬细胞泡沫化为动脉粥样硬化早期模型, 从脂肪酸代谢轮廓的层面明确早期动脉粥样硬化代谢紊乱及羟基红花黄色素 A 调控作用, 网络分析表明脂肪酸生物合成通路是羟基红花黄色素 A 治疗动脉粥样硬化的重要代谢通路, 推测 OLAH 可能是羟基红花黄色素 A 调控脂肪酸代谢的潜在靶点, 这一研究结果为动脉粥样硬化的临床治疗及新药研发提供参考。

References

- [1] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell*, 2011, 145: 341–355.
- [2] Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18: 139–143.
- [3] Wu D, Liu J, Pang X, et al. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34: 1706–1712.
- [4] Perdomo L, Beneit N, Otero YF, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 75.
- [5] Song Y, Zhang LJ, Li H, et al. Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 111.
- [6] Javad ZR, Hossein N, Reza M, et al. Effect of unsaturated fatty acids on molecular markers of cholesterol homeostasis in THP-1 macrophages [J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2013, 15: 554–559.
- [7] Xu WJ, Wei ZY, Dong JJ, et al. Global metabolomics reveals the metabolic dysfunction in ox-LDL induced macrophage-derived foam cells [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 586.
- [8] Yan CL, Yang J, Han JH, et al. Advances in anti-atherosclerosis mechanisms of traditional Chinese medicine [J]. *Tianjin Med J (天津医药)*, 2014, 28: 904–913.
- [9] MaYinuer-YeErkenbieke. Safflower Flavonoids Extraction and Purification and *in vitro* Activity Against Atherosclerosis Effect Evaluation (红花总黄酮提取纯化及体外抗动脉粥样硬化药效活性评价) [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2014.
- [10] Liu XY, Liu YQ, Chen MC, et al. A metabolomics study of the inhibitory effect of 17-beta-estradiol on osteoclast proliferation and differentiation [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 635–646.
- [11] Chen SL, Hoene M, Li J, et al. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl *tert*-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1298: 9–16.
- [12] Zhou Y, Wo XD, Lu DZ. The model establishment and identification of RAW264.7 macrophage-derived foam cell [J]. *Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志)*, 2010, 18: 687–690.
- [13] Xia JD, Sinelnikov I, Han B, et al. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: W251–W257.
- [14] Wang DF, Wang YL, Wang YW, et al. Effect of Huangqin Tang on serum metabolic profile in rats with ulcerative colitis based on UHPLC-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1306–1312.
- [15] Gao J, Tarcea VG, Karnovsky A, et al. Metscape: a cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic data in the context of human metabolic networks [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 971–973.
- [16] Polonskaya YV, Shramko VS, Morozov SV, et al. Balance of fatty acids and their correlations with parameters of lipid metabolism and markers of inflammation in men with coronary atherosclerosis [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 164: 33–35.
- [17] Liu JT. Progress in inflammatory pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci (西安交通大学学报)*, 2015, 36: 141–152.
- [18] Lee JY, Ye JP, Gao ZG, et al. Reciprocal modulation of toll-like Receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids [J]. *Biol Chem J*, 2003, 278: 37041–37051.
- [19] Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36: 229–240.
- [20] Assy N, Nassar F, Nassar G. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 1809–1815.
- [21] Ohlrogge JB, Shine WE, Stumpf PK. Fat metabolism in higher plants. Characterization of plant acyl-ACP and acyl-CoA hydrolases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1978, 189: 382–391.