

· 实验研究 ·

补肾降脂方干预 $Apoe^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的
全谱代谢组学研究

李琳丹, 张悦, 邢三丽, 申定珠*

上海中医药大学 上海市中医老年医学研究所, 上海 200031

摘要 目的: 基于组织全谱代谢组学探讨补肾降脂方干预 $Apoe^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化(AS)的效应机制。方法: 高脂饮食喂饲 $Apoe^{-/-}$ 小鼠复制 AS 模型, 随机分为模型(M)组、补肾(BS)组、他汀(ATV)组, 同品系、同周龄 C57BL/6J 小鼠为正常(C)组, 每组 12 只, 干预 12 周。超高效液相色谱串联二级质谱(UH-PLC-MS/MS)联合 UPLC-Orbitrap 质谱非靶脂质组学平台分别检测小鼠主动脉代谢物及脂质, 生物信息学深入分析标志性差异代谢物及脂质。结果: 高脂饮食可诱导 $Apoe^{-/-}$ 小鼠主动脉呈典型 AS 病变与脂质蓄积。小鼠主动脉代谢物主要归属于脂质和类脂分子; 与 M 组比较, BS 组正离子模式下差异代谢物上调 7 个、下调 2 个, 负离子模式下上调 12 个、下调 3 个; 补肾降脂方可逆转标志性差异代谢物 5-胸苷酸(dTMP)、米那普伦(Milnacipran)的表达趋势; KEGG 分析提示 dTMP 显著富集于嘧啶代谢通路。脂质组学检测共鉴定脂质分子 3 897 个, 归属 44 个脂质亚类。与 M 组比较, BS 组差异脂质分子显著上调 102 个、下调 24 个; 补肾降脂方可逆转磷脂酰丝氨酸(PS)、甘油三酯(TG)及溶血磷脂胆碱(LPC)亚类相关 30 个标志性差异脂质分子的表达趋势; 相关性分析表明标志性差异脂质分子之间存在高度相关性。结论: 补肾降脂方从组织全谱代谢组学层面干预 $Apoe^{-/-}$ 小鼠 AS 的机制可能通过嘧啶代谢通路调控小鼠主动脉代谢物 dTMP 以及调节 PS、TG 及 LPC 相关脂质分子表达有关。

关键词 补肾降脂方; 动脉粥样硬化; 全谱代谢组学; 非靶代谢组学; 非靶脂质组学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2026)02-0006-09

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.260025

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)作为心脑血管事件的关键病理基础, 机体代谢紊乱在其形成、发展进程中扮演重要角色^[1]。作为一种系统、整体层面的组学检测技术, 全谱代谢组学融合了传统代谢组学与脂质组学分析, 旨在获取生物体内代谢物的全景视图, 了解其代谢物的变化趋势、代谢途径的活动情况及其生理、病理状态下的相互关系, 近年来全谱代谢组学技术广泛运用于中医药干预心血管疾病相关研究^[2-4]。课题组前期研究证实, 补肾降脂方可有效干预高脂饮食诱导的 $Apoe^{-/-}$ 小鼠 AS^[5-7], 但其机制有待深入研究。本研究拟从组织全谱代谢组学视角进一步探究补肾降

脂方有效干预 $Apoe^{-/-}$ 小鼠 AS 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

12 周龄雄性 SPF 级 $Apoe^{-/-}$ 小鼠与同品系、同周龄 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华生物科技有限公司[动物生产许可证号: SCXK(京)2021-0006], 喂饲于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物实验室, 温度(24±1)℃, 相对湿度 50%~70%, 12/12 h 明暗交替照明。本研究已通过上海中医药大学实验动物福利与伦理审查(PZSHUTCM220711021), 实验操作严格遵循上海中医药大学动物实验伦理委员会相关规章制度。

1.2 药物与主要试剂

补肾降脂方颗粒, 江苏江阴天江药业有限公司, 药物组成: 菟丝子 10 g, 枸杞子 10 g, 覆盆子 10 g, 沙苑子 10 g, 女贞子 10 g, 黑豆 10 g; 阿托伐他汀钙片, 辉瑞制药有限公司(规格: 20 mg/片, 批号: DT1537)。

乙腈, 德国 Merck 公司(批号: 1499230-935); 异

收稿日期: 2024-12-17 修回日期: 2025-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074506, 81873348)

作者简介: 李琳丹(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治老年病临床与基础研究。

*通信作者: 申定珠(1975-), 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医药防治老年病临床与基础研究。

丙醇,美国 Thermo Fisher Scientific 公司(批号:A451-4);甲醇,美国 Thermo Fisher Scientific 公司(批号:A456-4)。

1.3 主要仪器

Orbitrap Exploris™ 480、Q-Exactive Plus 质谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Vanquish UH-PLC 超高压液相色谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;UHPLC Nexera LC-30A 超高效液相色谱仪,日本 SHIMADZU 公司;ACQUITY UPLC BEH Amide/CSH C18 1.7 μm 色谱柱(规格:2.1 mm $\times$ 100 mm),美国 Waters 公司;BX51 光学显微镜,日本 Olympus 株式会社;Pannoramic MIDI 数字切片扫描仪,匈牙利 3DHISTECH 公司。

1.4 分组与造模

高脂饮食喂饲雄性 *Apoe*^{-/-} 小鼠复制经典 AS 模型^[8]。12 周龄雄性 *Apoe*^{-/-} 小鼠随机分为模型(M)组、补肾(BS)组、他汀(ATV)组,每组 12 只;同品系、同周龄 C57BL/6J 小鼠 12 只为正常(C)组。

1.5 干预与取材

BS 组、ATV 组分别予以补肾降脂方、阿托伐他汀水溶液灌胃(BS 组灌胃剂量:3 970.26 mg/kg;ATV 组灌胃剂量:2.055 mg/kg);C 组、M 组均给予等体积蒸馏水灌胃,每日 1 次。干预 12 周后,以 2.5% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,每组 6 只小鼠给予 4% 多聚甲醛灌注,取主动脉连同心脏,置 10% 福尔马林保存待石蜡、冰冻切片;其余小鼠取胸主动脉至腹主动脉段液氮速冻,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,以备全谱代谢组学检测。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 小鼠主动脉粥样病理形态与脂质蓄积

HE、油红 O 染色分别检测小鼠主动脉粥样病理形态与脂质蓄积,光学显微镜、全自动数字切片扫描仪采集图像,Image J 软件分析小鼠主动脉粥样斑块、红染脂质面积比。主动脉粥样斑块面积比 = 斑块面积/主动脉粥样管腔总面积,主动脉粥样红染脂质面积比 = 红染脂质面积/主动脉粥样管腔总面积。

1.6.2 非靶代谢组学检测

1.6.2.1 样本预处理

取小鼠主动脉样本置 4 $^{\circ}\text{C}$ 解冻,加入预冷甲醇/乙腈/水溶液(2:2:1, V/V),涡旋混合,低温超声 30 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 取上清液真空干燥, 100 μL 乙腈水溶液(乙腈:水 = 1:1, V/V)复溶,涡旋, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液进样分析。

1.6.2.2 色谱条件

超高效液相色谱系统 HILIC 色谱柱分离,柱温

25 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.5 mL/min;进样量 2 μL ;流动相 A:水 + 25 mmol/L 乙酸铵 + 25 mmol/L 氨溶液,流动相 B:乙腈;梯度洗脱:0 ~ 0.5 min, 95% B;0.5 ~ 7 min, 95% ~ 65% B;7 ~ 8 min, 65% ~ 40% B;8 ~ 9 min, 40% B;9 ~ 9.1 min, 40% ~ 95% B;9.1 ~ 12 min, 95% B。

1.6.2.3 质谱条件

ESI 源及质谱参数:雾化气辅助加热气 1(Gas1) 60, 辅助加热气 2(Gas2) 60, 气帘气 30 psi, 离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压正离子模式 3 500 V, 负离子模式 2 800 V;一级质荷比 70 ~ 12 000 Da, 分辨率 60 000, 扫描时间 100 ms, 二级扫描 70 ~ 1 200 Da, 二级分辨率 60 000, 扫描时间 100 ms, 动态排除时间 4 s。

1.6.3 非靶脂质组学检测

1.6.3.1 样本预处理

取小鼠主动脉样本置 4 $^{\circ}\text{C}$ 解冻,与 200 μL 水、20 μL 内脂质标准混合涡旋,加入 800 μL MTBE 涡旋混合,加入 240 μL 预冷甲醇涡旋混合,低温水浴超声 20 min,置室温 30 min, 12 000 r/min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上层有机相,氮气吹干,加入 200 μL 90% 异丙醇/乙腈溶液复溶(质谱分析),充分涡旋,取 90 μL 复溶液, 12 000 r/min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清液进样分析。

1.6.3.2 色谱条件

C18 色谱柱;柱温 45 $^{\circ}\text{C}$;流速 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。流动相组成 A:乙腈水溶液(乙腈:水 = 6:4, V/V) + 0.1% 甲酸 + 0.1 mmol/L 甲酸铵, B:乙腈异丙醇溶液(乙腈:异丙醇 = 1:9, V/V) + 0.1% 甲酸 + 0.1 mmol/L 甲酸铵。梯度洗脱:0 ~ 3.5 min, 40% B;3.5 ~ 13 min, 40% ~ 75% B;13 ~ 19 min, 75% ~ 99% B;19 ~ 24 min, 40% B。

1.6.3.3 质谱条件

ESI 源条件:加热器温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 护套气体流量 45 arb, 辅助气体流量 15 arb, 扫气流量 1 arb, 喷雾电压 3.0 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, S-Lens 射频电平 50%, MS1 扫描范围:200 ~ 1 800。脂质分子和脂质碎片的质荷比于每次全扫描后采集 10 个碎片图谱 MS2 scan, HCD。MS1 在 M/Z 200 时分辨率:70 000, MS2 在 M/Z 200 时分辨率:17 500。

1.7 数据与统计分析

原始数据经 ProteoWizard 转换为 mzXML 格式,采用 XCMS online 3.7.1 软件峰对齐、保留时间校正及峰面积提取;脂质分子的峰识别、峰提取、脂质鉴定(二级鉴定)等一体化分析均采用 LipidSearch 软件;R 语言进行数据归一化处理及多变量分析;生物信息学分析(PLS-DA、OPLS-DA、置换检验及 KEGG 通路分析);计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较采用独

立样本 t 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠主动脉窦 HE 染色

C 组未见明显 AS 斑块; 与 C 组比较, M 组可见明显 AS 斑块 ($P < 0.000 1$); 与 M 组比较, BS 组 AS 斑块面积显著减少 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 小鼠主动脉窦油红 O 染色

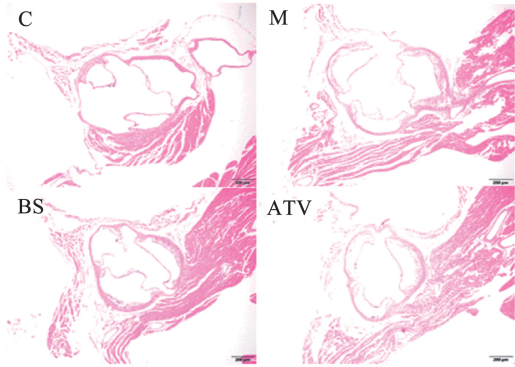
C 组无明显红染脂质; 与 C 组比较, M 组红染脂质

显著增加 ($P < 0.000 1$); 与 M 组比较, BS 组红染脂质明显减少 ($P < 0.001, P < 0.000 1$)。见图 2。

2.3 小鼠主动脉非靶代谢组学分析

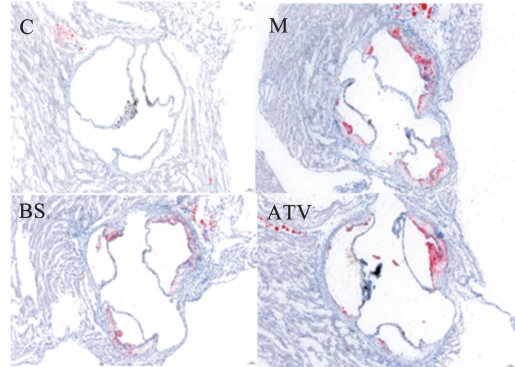
2.3.1 QC 样本总离子流图分析

QC 样本总离子流图结果表明, 正、负离子模式下各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠, 说明在整个实验过程中仪器误差引起的变异较小。见图 3。



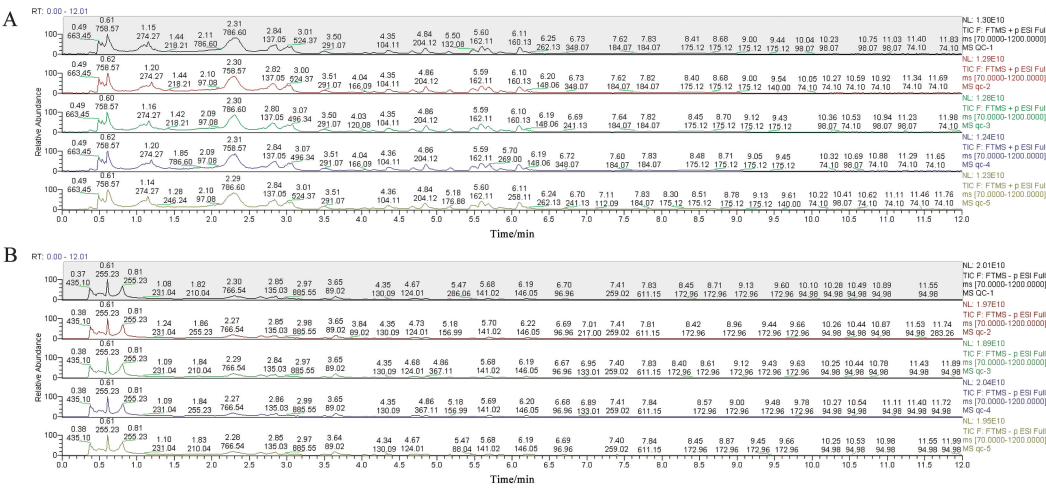
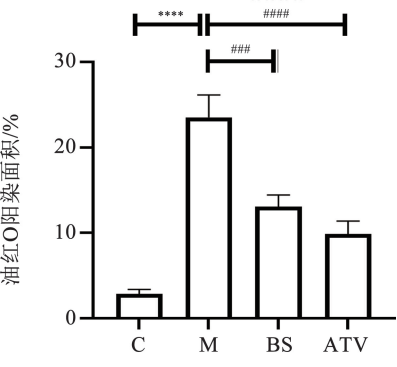
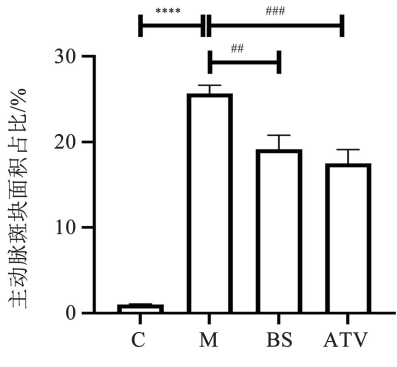
注: C. 正常组; M. 模型组; BS. 补肾组; ATV. 他汀组; 与正常组比较, $*** P < 0.000 1$; 与模型组比较, $## P < 0.01, ### P < 0.001$ 。

图 1 小鼠主动脉窦 HE 染色 ($\times 40, n = 3$)



注: C. 正常组; M. 模型组; BS. 补肾组; ATV. 他汀组; 与正常组比较, $*** P < 0.000 1$; 与模型组比较, $### P < 0.001, #### P < 0.000 1$ 。

图 2 小鼠主动脉窦油红 O 染色 ($\times 100, n = 3$)



注: A. 正离子模式; B. 负离子模式。

图 3 QC 样本总离子流图重叠谱图

2.3.2 代谢物鉴定及化学分类

共鉴定代谢物 1 697 个(正离子模式 1 074 个,负离子模式 623 个);代谢物化学分类分析表明,脂质和

类脂质分子 Lipids and lipid-like molecules 占比最大(24.455%),其次为有机酸及其衍生物 Organic acids and derivatives(22.451%)。见图 4。

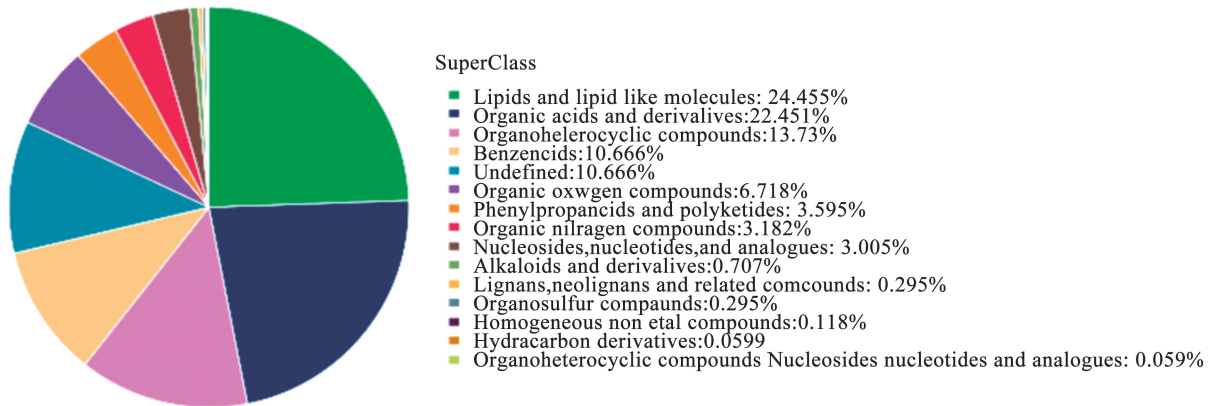
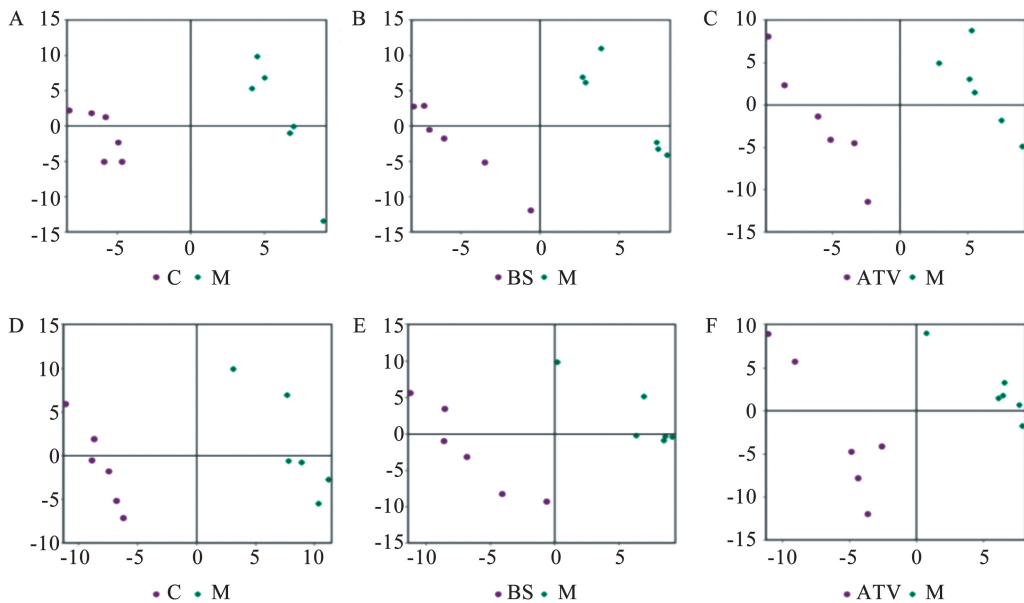


图 4 代谢物鉴定 - 化学分类

2.3.3 PLS-DA 分析

正、负离子模式下, M - C 组间代谢物差异明显 ($R_y^2 = 0.999$, $Q^2 = 0.615$; $R_y^2 = 0.989$, $Q^2 = 0.601$); BS - M 组间代谢物差异明显 ($R_y^2 = 0.999$, $Q^2 =$

0.537 ; $R_y^2 = 0.974$, $Q^2 = 0.544$); ATV - M 组间代谢物差异明显 ($R_y^2 = 0.999$, $Q^2 = 0.721$; $R_y^2 = 0.991$, $Q^2 = 0.425$)。见图 5。



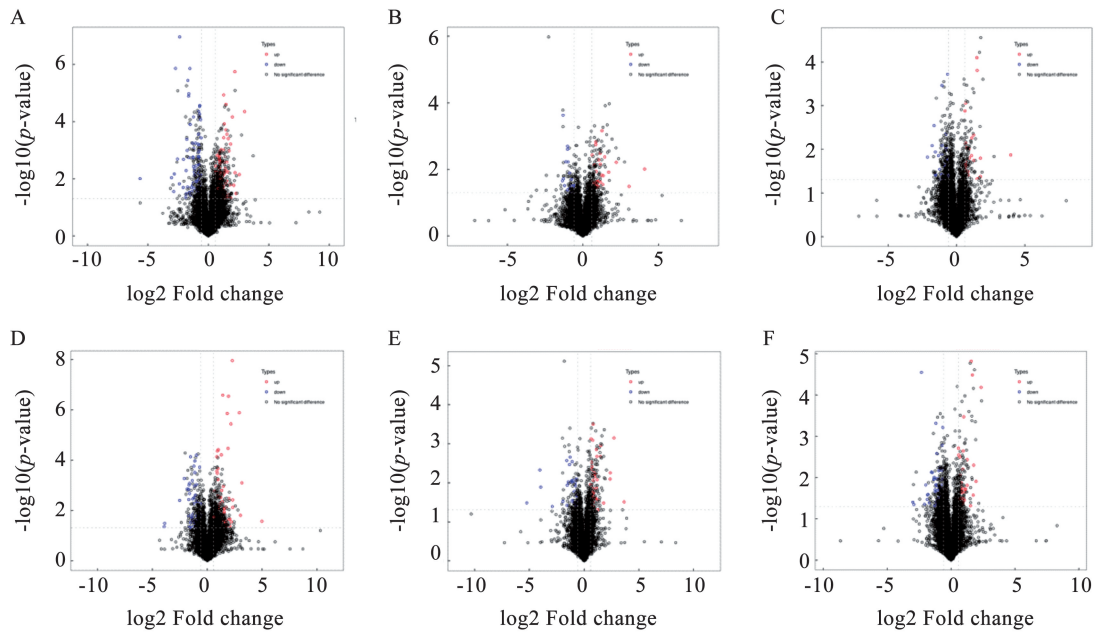
注:正离子模式: A. (M vs C); B. (BS vs M); C. (ATV vs M); 负离子模式: D. (M vs C); E. (BS vs M); F. (ATV vs M)。

图 5 PLS-DA 分析

2.3.4 火山图分析

火山图分析($FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$, $P < 0.05$)表明,与 C 组比较, M 组正离子模式下差异代谢物上调 29 个、下调 20 个,负离子模式下上调 17 个、下调

17 个。与 M 组比较, BS 组正离子模式下差异代谢物上调 7 个、下调 2 个,负离子模式下上调 12 个、下调 3 个; ATV 组正离子模式下差异代谢物上调 3 个、下调 2 个;负离子模式下上调 2 个、下调 8 个。见图 6。



注：正离子模式：A. M vs C; B. BS vs M; C. ATV vs M; 负离子模式：D. M vs C; E. BS vs M; F. ATV vs M。

图 6 代谢组学火山图

2.3.5 标志性差异代谢物分析

以 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 及 FC 值 ($M/C > 1$, $BS/M < 1$ 且 $ATV/M < 1$) 或 ($M/C < 1$, $BS/M > 1$ 且 $ATV/M > 1$) 为判定标准进行显著性差异代谢物分析。结果显示，

补肾降脂方可逆转标志性差异代谢物 5-胸苷酸 (Deoxythymidine 5'-phosphate, dTMP)、米那普仑 (Milnacipran) 的表达趋势。见表 1。

表 1 标志性差异代谢物

代谢物名称	质荷比	保留时间/min	Score	M/C	FC 值	
					BS/M	ATV/M
2-linoleoylglycerol	337.273 41	48.834 750	0.982 319 826 709 113	2.406 832	1.631 989	0.967 745
Milnacipran	230.139 56	627.329 00	0.994 537 232 107 786	1.722 890	0.662 155	0.481 799
D-glucose 6-phosphate	283.018 61	444.649 50	0.997 034 118 002 513	1.735 779	0.980 359	0.664 444
1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	509.289 05	144.710 00	0.972 355 47	3.552 542	1.972 527	1.080 571
Pg 36:4	769.502 78	48.458 40	0.957 969 568 518 849	2.425 876	1.855 770	0.985 498
Deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP)	321.043 95	25.290 20	0.942 982 367 215 532	1.999 784	0.642 784	0.641 777
Irisxanthone	435.102 17	23.219 30	0.991 581 889 570 375	0.384 128	5.237 799	174.553 814

注：C. 正常组；M. 模型组；BS. 补肾组；ATV. 他汀组。

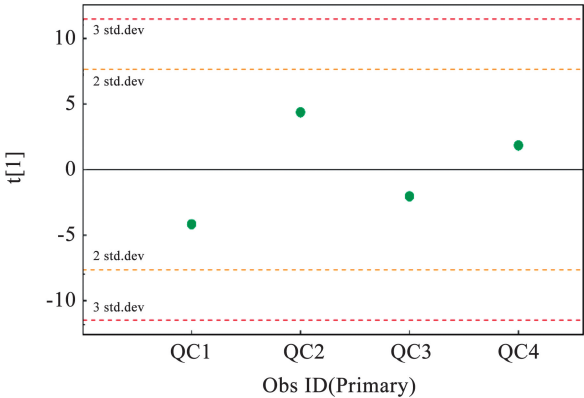
2.3.6 KEGG 通路分析

采用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 对标志性差异代谢物进行通路富集分析,提示 dTMP 可显著富集于嘧啶代谢通路。

2.4 小鼠主动脉非靶脂质组学分析

2.4.1 QC 样本多变量控制分析

QC 样本多变量控制分析结果表明,QC 样本在正常范围内波动,说明仪器稳定、数据可靠。见图 7。



注：横坐标为 QC 样本；纵坐标为标准差。

图 7 QC 样本 MCCA 图

2.4.2 脂质分子鉴定

共鉴定脂质分子 3 897 个,包括磷脂酰胆碱、甘油三酯、磷脂酰乙醇胺等 44 个脂质亚类。见图 8。

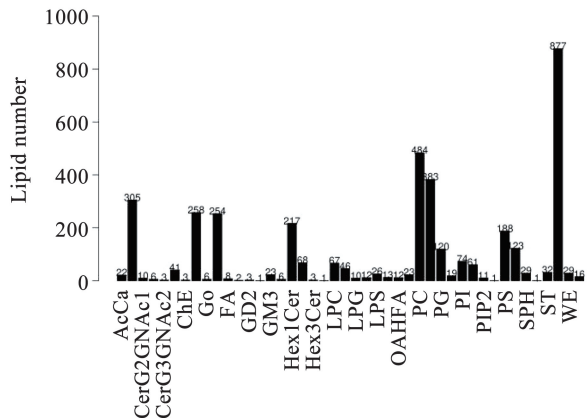
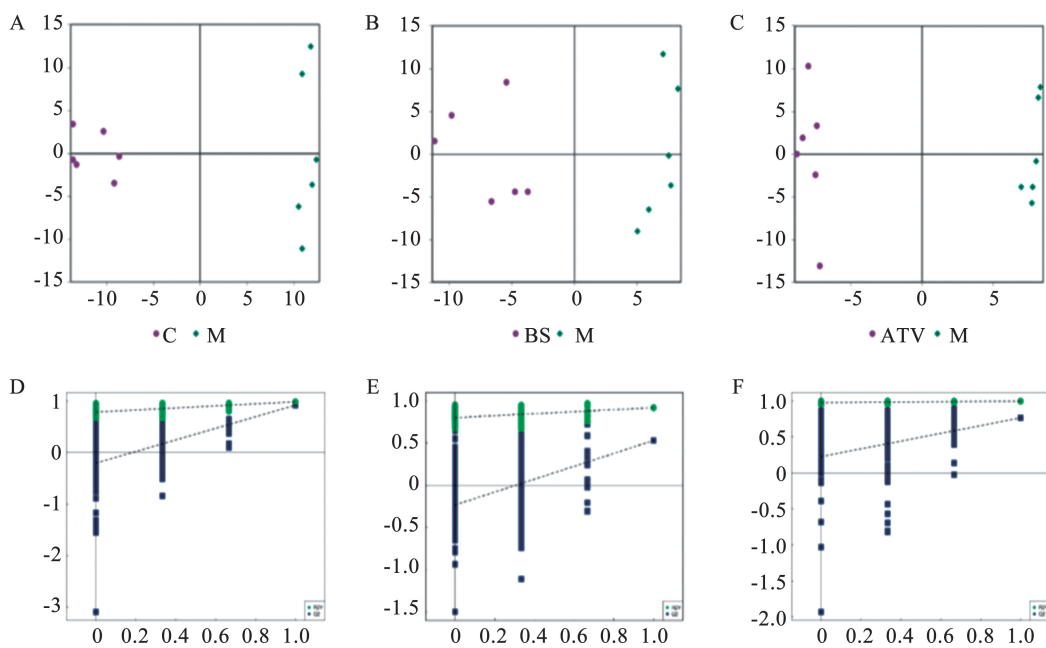


图 8 脂质分子-脂质亚类数量统计图

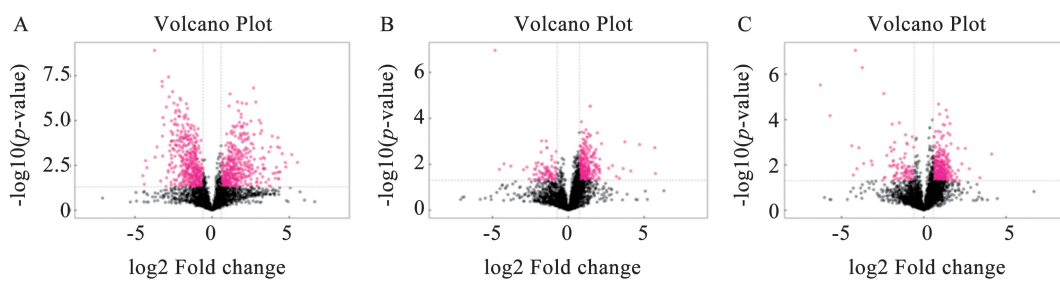
2.4.3 OPLS-DA 分析与置换检验

OPLS-DA 分析表明,样本组间、组内变异分离度



注:A~C 为 OPLS-DA 分析;D~F 为置换检验。A. M vs C;B. BS vs M;C. ATV vs M;D. M vs C;E. BS vs M;F. ATV vs M。

图 9 OPLS-DA 分析与置换检验



注:A. M vs C;B. BS vs M;C. ATV vs M。

图 10 脂质组学火山图

明显;置换检验说明原模型不存在过拟合现象。见图 9。

2.4.4 火山图分析

火山图分析($FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$, $P < 0.05$)结果表明,与 C 组比较,M 组显著性差异脂质分子上调 87 个、下调 114 个;与 M 组比较,BS 组显著性差异脂质分子上调 102 个、下调 24 个,ATV 组显著性差异脂质分子上调 87 个、下调 16 个。见图 10。

2.4.5 标志性差异脂质分子分析

以 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 及 FC 值 ($M/C > 1$, $BS/M < 1$ 且 $ATV/M < 1$) 或 ($M/C < 1$, $BS/M > 1$ 且 $ATV/M > 1$) 为判定标准行标志性差异脂质分子分析。结果表明,补肾降脂方可显著调节磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、溶血磷脂胆碱 (Lysophosphatidylcholine, LPC) 亚类相关 30 个标志性差异脂质分子。见表 2。

表 2 标志性差异脂质分子

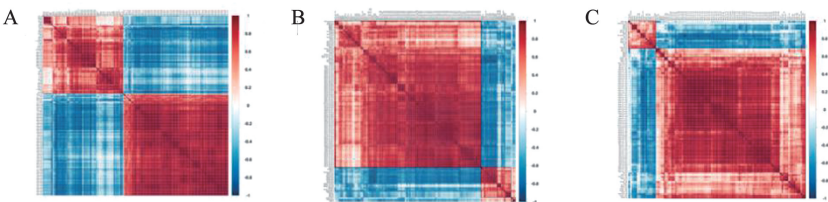
序号	脂质名称	脂质亚类	脂质分子式	保留时间/min	FC 值		
					M/C	BS/M	ATV/M
1	PS(35:1e) – H	PS	C ₄₁ H ₇₉ O ₉ N ₁ P ₁	7.908 00	27.516 860	0.194 465	0.109 359
2	TG(20:1_18:1_18:1) + NH ₄	TG	C ₅₉ H ₁₁₂ O ₆ N ₁	16.753 76	0.693 225	1.395 298	1.411 853
3	TG(18:1_18:1_18:1) + NH ₄	TG	C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆ N ₁	16.550 63	0.688 910	1.522 331	1.718 389
4	TG(18:1_18:1_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆ N ₁	16.277 28	0.615 411	1.520 333	1.726 978
5	TG(16:1_18:1_18:1) + NH ₄	TG	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆ N ₁	16.226 09	0.593 817	1.495 502	1.920 848
6	TG(17:0_18:1_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₆ H ₁₀₆ O ₆ N ₁	16.401 38	0.567 372	1.570 123	1.772 622
7	TG(19:1_18:1_18:1) + NH ₄	TG	C ₅₈ H ₁₁₀ O ₆ N ₁	16.668 24	0.483 976	1.468 430	1.538 471
8	TG(20:1_18:1_18:3) + NH ₄	TG	C ₅₉ H ₁₀₈ O ₆ N ₁	16.314 94	0.482 398	1.370 585	1.591 377
9	TG(18:1_18:2_21:0) + NH ₄	TG	C ₆₀ H ₁₁₄ O ₆ N ₁	16.917 69	0.479 096	1.520 169	1.425 126
10	TG(16:0_14:0_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₁ H ₉₈ O ₆ N ₁	15.833 85	0.465 070	1.540 587	2.227 938
11	TG(18:1_17:1_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₆ H ₁₀₄ O ₆ N ₁	16.093 50	0.451 124	1.591 483	1.805 381
12	TG(18:1_18:1_22:4) + NH ₄	TG	C ₆₁ H ₁₁₀ O ₆ N ₁	16.430 76	0.439 183	1.468 238	1.564 169
13	TG(20:5_18:2_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₆ N ₁	15.075 37	0.404 045	1.883 451	1.826 608
14	TG(16:1_18:2_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆ N ₁	15.539 58	0.377 730	1.560 260	2.131 462
15	TG(19:1_18:1_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₈ H ₁₀₈ O ₆ N ₁	16.396 56	0.377 599	1.474 711	1.516 560
16	TG(12:1e_12:2_12:2) + H	TG	C ₃₉ H ₆₇ O ₅	10.664 00	0.358 794	1.734 678	2.401 322
17	TG(16:1_14:0_16:1) + NH ₄	TG	C ₄₉ H ₉₄ O ₆ N ₁	15.403 74	0.349 757	1.583 168	2.339 298
18	TG(18:1_18:1_22:5) + NH ₄	TG	C ₆₁ H ₁₀₈ O ₆ N ₁	16.150 77	0.346 025	1.504 692	1.530 004
19	TG(16:0_8:0_18:1) + NH ₄	TG	C ₄₅ H ₈₈ O ₆ N ₁	14.744 66	0.325 795	1.653 759	2.343 948
20	TG(16:1_14:1_18:1) + NH ₄	TG	C ₅₁ H ₉₆ O ₆ N ₁	14.985 30	0.324 360	1.901 782	2.216 149
21	TG(16:0_14:1_16:1) + NH ₄	TG	C ₄₉ H ₉₄ O ₆ N ₁	14.855 70	0.318 404	1.796 043	2.545 906
22	TG(18:1_17:1_18:3) + NH ₄	TG	C ₅₆ H ₁₀₂ O ₆ N ₁	15.756 14	0.313 116	1.517 760	1.766 905
23	TG(16:1_10:0_18:1) + NH ₄	TG	C ₄₇ H ₉₀ O ₆ N ₁	14.818 91	0.307 222	1.678 342	2.469 521
24	TG(18:1_18:2_18:3) + NH ₄	TG	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₆ N ₁	15.610 29	0.303 833	1.537 862	1.767 979
25	TG(18:2_14:2_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₃ H ₉₄ O ₆ N ₁	14.553 03	0.276 651	1.737 627	2.339 220
26	TG(8:0_18:1_18:2) + NH ₄	TG	C ₄₇ H ₈₈ O ₆ N ₁	14.088 58	0.271 523	1.580 674	2.100 373
27	TG(18:1_18:2_20:4) + NH ₄	TG	C ₅₉ H ₁₀₄ O ₆ N ₁	15.851 83	0.270 842	1.757 522	1.947 572
28	TG(22:5_18:2_18:2) + NH ₄	TG	C ₆₁ H ₁₀₄ O ₆ N ₁	15.639 95	0.212 100	1.647 278	1.477 509
29	TG(18:3_18:2_18:2) + NH ₄	TG	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₆ N ₁	15.220 06	0.183 482	1.767 110	2.137 865
30	LPC(16:1) + HCOO	LPC	C ₂₅ H ₄₉ O ₉ N ₁ P ₁	1.373 43	0.047 428	13.552 600	17.445 560

注:C. 正常组; M. 模型组; BS. 补肾组; ATV. 他汀组。

2.4.6 相关性分析

脂质分子相互之间存在高度相关性。见图 11。

相关性分析(VIP > 1, P < 0.05)表明, 标志性差异



注:A. M vs C ;B. BS vs M;C. ATV vs M;红色. 正相关,蓝色. 负相关。

图 11 脂质分子相关性热图

3 讨论

机体代谢紊乱在 AS 形成、发展中发挥重要作用^[1]。作为一种综合的代谢组学分析方法,全谱代谢组学通过对生物体内代谢物的全面、系统分析,进而筛选出疾病相关的潜在生物标志物^[9-11]。既往就心血管疾病从外周血层面行全谱代谢组学的报道屡有,而针对靶器官的组织全谱代谢组学研究却鲜有涉及^[12-14]。本虚标实乃 AS 病机之本,补肾降脂方由菟丝子、枸杞子、覆盆子、沙苑子、女贞子、黑豆组成,共奏补肾益精、降脂利脉之功。前期研究证实该方可调控 *ApoE*^{-/-} 小鼠脂质代谢紊乱进而有效干预治疗 AS^[5-7]。

本研究组织病理学结果显示, M 组小鼠主动脉窦 AS 斑块与红染脂质面积较之 C 组明显减少,提示 AS 模型制备成功且存在脂质代谢紊乱。非靶代谢组学检测 QC 样本总离子流图分析表明实验重复性好、数据可靠。代谢物鉴定及化学分类信息表明,正、负离子模式下共鉴定差异代谢物 1 697 个(正、负离子模式各 1 074、623 个);脂质和类脂质分子是其中占比最大(24.455%),其次是有机酸及其衍生物(22.451%)。PLS-DA 分析可显著区分各对比组组间及组内变异进而反映样本间生物学差异^[15]。代谢组学火山图结果表明,与 C 组比较, M 组正离子模式下差异代谢物上调 29 个、下调 20 个,负离子模式下上调 17 个、下调 17 个;与 M 组比较, BS 组正离子模式下差异代谢物上调 7 个、下调 2 个,负离子模式下上调 12 个、下调 3 个; ATV 组正离子模式下差异代谢物上调 3 个、下调 2 个,负离子模式下上调 2 个、下调 8 个。补肾降脂方可显著逆转代谢物 dTMP、Milnacipran 的表达趋势。KEGG 通路分析提示 dTMP 可显著富集于嘧啶代谢通路。dTMP 是 DNA 合成的重要组成部分之一,主要通过两种方式参与生物化学过程:一是作为 DNA 复制的直接前体,二是作为细胞内信号分子参与多种生理功能调节。在生物体内, dTMP 由脱氧尿苷酸单磷酸(dUMP)经由胸苷酸合酶(Thymidylate Synase, TS)催化生成^[16]。嘧啶是核酸合成、糖基化、磷脂合成及细胞生物体内平衡所必需的,在维持线粒体丙酮酸氧化、三羧酸循环、脂质生成以及细胞分化中发挥重要作用,其产生包括从头合成途径和补救合成途径两种代谢途径^[17]。作为一种含氮化合物,嘧啶与 AS 发生、发展密切相关^[18]。嘧啶代谢失调亦为 AS 相关疾病的重要危险因素^[19]。

非靶脂质组学检测 QC 样本多变量控制分析表明实验重复性好、数据可靠。共鉴定脂质分子 3 897 个,

归属于磷脂酰胆碱、甘油三酯、磷脂酰乙醇胺等 44 个脂质亚类。OPLS-DA 分析可显著区分各对比组组间及组内变异以反映样本间生物学差异^[20]。火山图分析结果表明,与 C 组比较, M 组显著性差异脂质分子上调 87 个、下调 114 个;与 M 组比较, BS 组显著性差异脂质分子上调 102 个、下调 24 个; ATV 组显著性差异脂质分子上调 87 个、下调 16 个。补肾降脂方可显著调节 PS、TG、LPC 亚类相关 30 个标志性差异脂质分子;各组别标志性差异脂质分子相互之间存在高度相关性。

综上,本研究从组织全谱代谢组学整体层面初步探讨了补肾降脂方有效干预 *ApoE*^{-/-} 小鼠 AS 的作用机制,揭示补肾降脂方可能通过嘧啶代谢通路调控 *ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉代谢物 dTMP 以及调节 PS、TG、LPC 亚类相关脂质分子进而有效干预 AS,进而为从补肾论治 AS 提供了全新视角。

参考文献:

- [1] WU X, ZHANG H R. Omics approaches unveiling the biology of human atherosclerotic plaques [J]. Am J Pathol, 2024, 194(4): 482-498.
- [2] HAN X L, GROSS R W. The foundations and development of lipidomics [J]. J Lipid Res, 2022, 63(2): 100164.
- [3] TIAN H, NI Z, LAM S M, et al. Precise metabolomics reveals a diversity of aging-associated metabolic features [J]. Small Methods, 2022, 6(7): e2200130.
- [4] 张娟, 汤润, 任维, 等. 基于脂质组学的蛭龙活血通瘀胶囊抗动脉粥样硬化作用机制研究 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(12): 164-170, 180.
- [5] 贾庆玲, 申定珠. 补肾降脂方通过 PPAR γ -LXR α -ABCA1 通路干预 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的效应机制 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(4): 85-91.
- [6] CAO H, JIA Q L, SHEN D Z, et al. Bushen Jiangzhi formula reduces atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice through autophagy [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40(4): 593-601.
- [7] YAN L, JIA Q L, CAO H, et al. Effect of BuShen JiangZhi recipe on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by regulating the expression of anpep via mmu_circRNA_22187 [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021: 4738264.
- [8] BRESLOW J L. Mouse models of atherosclerosis [J]. Science, 1996, 272(5262): 685-688.
- [9] QIU S, CAI Y, YAO H, et al. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 132.
- [10] GONG L L, YANG S, ZHANG W, et al. Discovery of metabolite profiles of metabolic syndrome using untargeted and targeted LC-MS based lipidomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 177: 112848.
- [11] IIDA M, HARADA S, TAKEBAYASHI T. Application of metabolomics to epidemiological studies of atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. J

- Atheroscler Thromb, 2019, 26(9): 747–757.
- [12] LI B L, QIAN Q, NIU L Y, et al. Multi-omics reveals protective effects of Ling Gui Zhu Gan Decoction on hyperlipidaemia in *Hamster* [J]. *Heliyon*, 2024, 10(16): e35426.
- [13] 孙萌, 刘伟, 刘海霞, 等. 早期冠状动脉粥样硬化患者血浆代谢组学研究[J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(1): 24–30.
- [14] 王姝瑞, 张翌蕾, 焦伟杰, 等. 益气通脉方对动脉粥样硬化模型小鼠血清代谢组学的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(17): 1788–1793.
- [15] XIA Z A, LIU W B, ZHENG F, et al. VISSA-PLS-DA-based metabolomics reveals a multitargeted mechanism of traditional Chinese medicine for traumatic brain injury [J]. *ASN Neuro*, 2020, 12: 1759091420910957.
- [16] URBANOWICZ K, TURYN J, SMOLENSKI R T, et al. Novel mass spectrometry-based assay for thymidylate synthase activity [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2024, 43(8): 743–750.
- [17] SAHU U, VILLA E, RECZEK C R, et al. Pyrimidines maintain mitochondrial pyruvate oxidation to support *de novo* lipogenesis [J]. *Science*, 2024, 383(6690): 1484–1492.
- [18] FILLIOS L C, NAITO C, ANDRUS S B, et al. The hypercholesteremic and atherogenic properties of various purines and pyrimidines [J]. *Am J Clin Nutr*, 1959, 7(1): 70–75.
- [19] 赵亚茹, 韩怡, 朴婧羽, 等. 基于 UPLC-MS 技术探究糖脂代谢病的血清代谢谱特征[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(5): 24–35.
- [20] WANG J W, ZHANG Y, LI W N, et al. Changes in the lipid profile of aqueous humor from diabetic cataract patients [J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2022, 11(11): 5.

Full-spectrum Metabolomic Study on the Intervention of Bushen Jiangzhi Formula in Atherosclerosis of *Apoe*^{-/-} Mice

LI Lindan, ZHANG Yue, XING Sanli, SHEN Dingzhu

Shanghai Geriatrics Institute of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200031, China

Abstract Objective: To explore the mechanism of Bushen Jiangzhi Formula in intervening atherosclerosis (AS) in *Apoe*^{-/-} mice based on comprehensive tissue metabolomics. Methods: *Apoe*^{-/-} mice were fed a high-fat diet to establish an AS model and randomly divided into model (M) group, Bushen (BS) group, and atorvastatin (ATV) group, with age-matched C57BL/6J mice as normal control (C) group. After 12 weeks of intervention, ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) combined with UPLC-Orbitrap mass spectrometry-based untargeted lipidomics was used to detect aortic metabolites and lipids. Bioinformatics analysis was performed to identify signature differential metabolites and lipids. Results: High-fat diet induced typical AS lesions and lipid accumulation in the aortic sinus of *Apoe*^{-/-} mice. Aortic metabolites were mainly classified as lipids and lipid-like molecules. Compared with the M group, the BS group showed 7 upregulated and 2 downregulated differential metabolites in positive ion mode, and 12 upregulated and 3 downregulated in negative ion mode. Bushen Jiangzhi Formula reversed the expression trends of signature differential metabolites, including deoxythymidine 5'-phosphate (dTMP) and milnacipran. KEGG analysis indicated that dTMP was significantly enriched in the pyrimidine metabolism pathway. Lipidomics identified 3,897 lipid molecules belonging to 44 subclasses. Compared with the M group, the BS group exhibited 102 significantly upregulated and 24 downregulated differential lipid molecules. Bushen Jiangzhi Formula reversed the expression trends of 30 signature differential lipids related to phosphatidylserine (PS), triglyceride (TG), and lysophosphatidylcholine (LPC) subclasses. Correlation analysis revealed strong interrelationships among these signature lipids. Conclusion: The mechanism of Bushen Jiangzhi Formula in intervening AS in *Apoe*^{-/-} mice may involve regulating aortic metabolite dTMP through the pyrimidine metabolism pathway and modulating the expression of PS-, TG-, and LPC-related lipid molecules at the comprehensive tissue metabolomics level.

Key words Bushen Jiangzhi Formula; Atherosclerosis; Comprehensive metabolomics; Untargeted metabolomics; Untargeted lipidomics