

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的类风湿性关节炎大鼠脂质代谢紊乱及祖师麻片的干预作用研究

彭琳秀¹, 单进军^{1,2,3}, 钱文娟¹, 谢彤^{2,3}, 康安^{1,2}, 狄留庆^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学 医学代谢组学中心, 江苏 南京 210023

摘要:目的 采用基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的代谢组学方法探索类风湿性关节炎大鼠内源性脂质代谢物在不同病程时期的变化趋势及祖师麻片对差异性代谢物的调控作用。方法 采用胶原诱导关节炎(CIA)大鼠模型, 分别收集对照组、模型组及祖师麻片[0.6 g/(kg·d)]组大鼠造模前(0 d)及造模后 14、21、36 d 的血清样本, 提取样本中脂质成分, 经生物信息学分析鉴定并寻找差异性代谢物, 并探讨代谢规律。结果 与对照组比较, 胶原诱导的 CIA 大鼠脂质代谢出现明显异常, 具体表现为 3 个酰基肉碱含量显著上升, TG 碳链中碳原子个数小于 58 的 TG 含量呈现下调趋势, 碳原子个数大于 58 的 TG 类物质含量显著升高。与模型组比较, 祖师麻片对 1 种磷脂酰丝氨酸、1 种神经酰胺、2 种酰基肉碱、4 种磷脂酰胆碱和 4 种三酰甘油的代谢水平有很好的调节作用。结论 类风湿性关节炎能够引发机体血清中脂质代谢紊乱, 祖师麻片对部分脂质代谢物有调控作用。

关键词: UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 类风湿性关节炎; 祖师麻片; 酰基肉碱; 代谢组学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)18-4356-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.021

Interventional effects of Zushima Tablets on lipid metabolomic disorder of rheumatoid arthritis in rats based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

PENG Lin-xiu¹, SHAN Jin-jun^{1,2,3}, QIAN Wen-juan¹, XIE Tong^{2,3}, KANG An^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System (DDS), College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Medical Metabolomics Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the changed trend of endogenous lipid metabolites in rats with rheumatoid arthritis during different disease periods and the regulation of Zushima Tablets on differential metabolites based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. **Methods** The collagen-induced arthritis (CIA) rats were established using bovine type II collagen. The serum samples were collected before (0 d) and 14, 21, and 36 d after model construction from control, model, and Zushima Tablets groups [0.6 g/(kg·d)], respectively. The lipids were extracted and identified by bioinformatics analysis to find the lipid differential metabolites. **Results** It was obviously observed that lipid metabolism disordered in CIA rats compared with the control group. The content of three acylcarnitines was increased significantly while the level of TG showed a downward trend in the CIA model group when the TG carbon chain was shorter than 58 carbon atoms. To the opposite, the content of TG substances with atomic number greater than fifty-eight in the model group was significantly higher than that of the control group. Zushima tablet obviously regulated the metabolism levels of a phosphatidylserine, a ceramide, two acylcarnitines, four phosphatidylcholines, and four triglycerides. **Conclusion** This study demonstrated that rheumatoid arthritis caused the disorder of lipid metabolism while Zushima Tablets had regulatory effects on some lipid metabolites.

Key words: UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; rheumatoid arthritis; Zushima Tablets; acylcarnitines; metabolomic

脂质是一类难溶于水而易溶于非极性溶剂的生物有机分子, 为机体的生命活动提供能量, 参与了机体的大部分生命活动^[1]。脂质分子在机体中发挥重要作用, 磷脂分子如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273655); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX17_1323)

作者简介: 彭琳秀(1992—), 女, 在读硕士。E-mail: 86745164@qq.com

*通信作者 狄留庆(1964—), 男, 博士生导师, 教授。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing928@163.com

PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LysoPC)、溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidyl ethanolamine, LysoPE)等作为结构支架,是构成生物膜结构的重要组分。甘油脂类则是机体储存和运输代谢所需能量的载体,可以为机体提供所需维生素和脂肪酸。脂类作为细胞的表面物质,与组织免疫和细胞识别等有密不可分的联系^[2]。研究表明,生物体脂质化合物代谢异常与多种疾病(糖尿病、心血管疾病、肿瘤等)的发生密切相关^[3-5]。

临床研究发现,类风湿性关节炎(RA)患者对心血管疾病的易感性较高,如动脉粥样硬化^[6]、心肌梗死^[7]等。邓敏婕^[8]测定了 RA 患者与健康体检者血清中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等指标,并与红细胞沉降率(ESR)、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP) 2 个 RA 的诊断指标进行相关性分析,结果发现 RA 患者血清中 TC、TG、LDL-C、脂蛋白 a [Lp (a)] 分别与 hs-CRP、ESR 呈正相关,而 HDL-C、载脂蛋白 A-I (Apo A-I) 与 hs-CRP、ESR 呈负相关。由此可见,RA 或将引发机体血脂代谢异常,从而诱发心血管并发症。然而,血清中脂质成分复杂多样,脂质代谢物在 RA 不同时期的变化情况还有待探索。

祖师麻片是由祖师麻药材经水提醇沉制备而成,是临床上治疗 RA 的常用药物。祖师麻片中成分复杂^[9-10],主要含有香豆素类、黄酮类、二萜原酸酯类等成分。文献报道证实^[11-12],香豆素具有镇痛、抗炎、抗菌等作用^[13-14],是治疗 RA 的有效成分。目前对祖师麻的报道大多集中于研究其化学成分、药理药效以及制剂开发,其发挥抗 RA 功效的药理机制尚不明确,有待进一步研究。本实验参考相关代谢组学分析方法^[15],并借助 Lipidblast 数据库^[16],研究胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠在疾病不同时期血清中脂质成分的变化情况,整合分析 RA 疾病状态下的差异代谢物,为 RA 发病机制及祖师麻片治疗 RA 的作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

34 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,购于上海杰思捷实验动物有限公司,实验动物许可证号 SCXK (沪) 2013-0006。按照南京中医药大学实验动物饲养原则,大鼠于相对湿度为(22±2)℃,

相对湿度为 45%~60%, 12 h 昼夜循环的环境中适应性饲养 5 d 后开始实验。

1.2 药品与试剂

祖师麻片(批号 20161202)购于秦皇岛市山海关药业有限责任公司;牛 II 型胶原蛋白购于美国 Chondrex 公司;冰醋酸购于南京化学试剂有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购于美国 Sigma-Aldrich 公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购于国药集团化学试剂有限公司;超纯水(Millipore 公司)。

甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚(MTBE)均为质谱纯,购自德国 Merck 公司;异丙醇、甲酸铵和乙酸铵均为质谱纯,购于美国 ROE 公司;内标化合物 LysoPE (17:1, 批号 LM171LPE-11)、鞘磷脂酰胆碱(sphingomyelin, SM, 17:0, 批号 170SM-13)、PE (17:0/17:0, 批号 LM170PE-19)购于 Avanti Polar Lipids 公司。

1.3 仪器

U3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Allegra64R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Savant SPD1010 真空离心浓缩仪(美国 Thermo 公司);Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 牛 II 型胶原蛋白乳剂制备

称取牛 II 型胶原蛋白 20 mg,溶于 10 mL 0.05 mol/L 的醋酸溶液中,即配成 2 mg/mL 的胶原溶液,4℃振荡过夜。加入 10 mL 弗氏完全佐剂,采用搅拌器乳化制成 1 mg/mL 的乳剂 I (以滴入水中不分散为标准),用于初次免疫。另制备一份胶原醋酸溶液,于乳化前加入弗氏不完全佐剂制备乳剂 II 用于加强免疫。

2.2 CIA 模型制备及给药

适应性饲养 5 d 后,将大鼠随机分为对照组($n=10$)和造模组($n=24$)。造模组大鼠于尾基部皮内注射 0.2 mL 牛 II 型胶原蛋白乳剂 I,该天记为第 1 天,初次免疫 1 周后,于第 7 天再次注射乳剂 II 0.1 mL 加强免疫。对照组大鼠于尾基部皮内注射等体积生理盐水。造模成功后(14 d)将造模组大鼠随机分为模型组和祖师麻片组。

取适量祖师麻片研磨后,用0.05% CMC-Na配制成质量浓度为0.06 g/mL的祖师麻片混悬液。大鼠造模成功后(14 d),祖师麻片组按照临床2倍等效剂量ig给药,即0.6 g/(kg·d)。对照组和模型组同时ig给予等体积0.05% CMC-Na溶液,共给药21 d。

2.3 血清样本收集及前处理

2.3.1 血清样本收集 分别于造模前(0 d)、造模成功后(14 d)、祖师麻片干预1周后(21 d)及干预3周后(36 d)于大鼠眼眶采集血液样本,室温静置1 h,4 000 r/min离心10 min分离血清,-80 ℃冰箱中保存,待测。

2.3.2 血清中脂质的提取^[15] -80 ℃冻存的血清样本于4 ℃解冻后,精密吸取40 μL血清,加入225 μL含内标[Lyso PE(17:1)、SM(17:0)、PE(17:0/17:0)]的冰甲醇溶液,涡旋10 s,加入750 μL MTBE于4 ℃震荡10 min,加入188 μL超纯水,涡旋20 s后于4 ℃、14 000 r/min离心2 min,吸取350 μL上清液挥干,在挥干后的样品中加入110 μL复溶液(甲醇-甲苯9:1),分别涡旋和超声10 min,14 000 r/min离心10 min后取上清进样分析。

2.3.3 质控(QC)样本制备 从120份血清样本中各吸取10 μL均匀混合后,吸取40 μL按照上述步骤进行提取操作。

2.4 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Acquity CSH C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),体积流量0.3 mL/min,正离子模式的流动相A:乙腈-水(6:4)+10 mmol/L甲酸铵+0.1%甲酸;B:异丙醇-乙腈(9:1)+10 mmol/L甲酸铵+0.1%甲酸。负离子模式的流动相A:乙腈-水(6:4)+10 mmol/L乙酸铵;B:异丙醇-乙腈(9:1)+10 mmol/L乙酸铵。梯度洗脱:0~4 min,15%~30% B;4~5 min,30%~48% B;5~22 min,48%~82% B;22~23 min,82%~99% B;23~24 min,99% B;24~24.2 min,99%~15% B;24.2~30 min,15% B。柱温65 ℃,进样量2 μL(正离子)/5 μL(负离子)。

2.4.2 质谱条件 Q-Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪,电离源:HESI源。扫描模式:正/负离子模式。质谱参数:喷雾电压为3.5 kV(+)和3.0 kV(-),离子源温度为306 ℃(+)和325 ℃(-),毛细管温度为300 ℃,鞘气和辅助气均为氮气,鞘气压力为275 kPa,辅助气压力为104 kPa,S-lens为50,扫描范围为 m/z 215~1 800。

2.5 数据处理

UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS正、负离子2种模式检测获得的raw谱图文件,经Abf Converter转换为abf格式后分别导入MS-DIAL软件中进行峰识别和峰对齐处理。物质鉴定是将一级和二级碎片离子和软件内置的Lipidblast数据库匹配,匹配度大于80%即为鉴定准确。MS-DIAL运算后生成包含质荷比(m/z)、保留时间(t_R)、代谢物名称(metabolites)及其在各样品中的峰高值的数据矩阵,该结果经MS-FLO^[17]标记处理重复峰、不同离子加合峰以及同位素峰,避免影响数据结构。整理得到的数据矩阵经sum及Pareto归一化后采用SIMCA-P 12.0(Umetrics AB,Umea,瑞典)进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等多变量统计分析。数据经log转换后采用SPSS进行单因素方差分析组间两两比较(方差齐的变量组间比较采用LSD分析;方差不齐的变量的组间比较采用Games-Howell),同时根据各物质在样本中的峰高的平均值计算fold change值,选取fold change>2及 $P<0.05$ 的物质为差异性代谢物。

3 结果

3.1 CIA大鼠一般情况观察

使用牛Ⅱ型胶原蛋白造模的大鼠在初次致炎后第11天陆续发病,具体表现为后肢僵直,活动减少,踝关节及足趾部位红肿发烫,个别大鼠尾根部出现结节,前肢红肿。至造模后第14天,共有4只大鼠未成功发病,模型发病率为83.33%。

3.2 方法学验证

采样过程中,通过3种方式监测实验操作误差及进行仪器稳定性考察:(1)正式进实验样本前进5针QC样本以平衡系统;(2)监测内标物质[正离子模式:Lyso PE(17:1)和SM(17:0);负离子模式:Lyso PE(17:1)和PE(17:0/17:0)]在所有样本中峰高值并计算RSD;(3)每进10针实验样本进一针空白溶剂样本和QC样本,利用包括QC样本在内的所有样本的PCA和各物质在QC样本中的变异度来检测仪器的重复性和可靠性。

经计算,正离子模式下血清样品中Lyso PE(17:1)和SM(17:0)峰高的RSD值分别为15.34%和18.15%;负离子模式下血清样品中Lyso PE(17:1)和PE(17:0/17:0)峰高的RSD值分别为20.16%和13.72%。计算已鉴定的各变量在所有QC样本中峰高的RSD值,并绘制RSD分布情况图(图1-A、

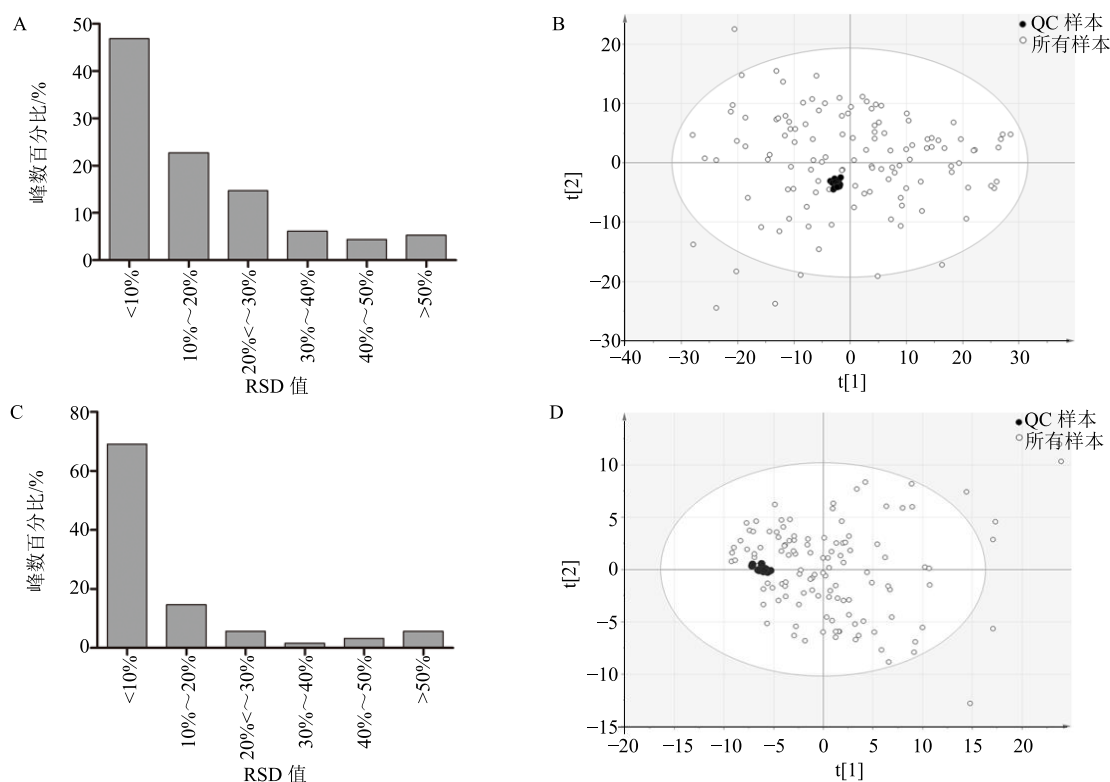


图 1 正 (A)、负 (C) 离子模式下已鉴定代谢物在血清 QC 样本中的 RSD 值分布情况及正 (B)、负 (D) 离子模式血清 QC 样本和所有血清样本 PCA 图

Fig. 1 RSD distribution of identified metabolites in serum QC samples based on positive (A) and negative (C) ion mode; PCA plots of QC samples and experimental samples based on positive (B) and negative (D) ion mode

C)。此外，将所有实验样本与 QC 样本一起进行 PCA，从样本在 PCA 图上的分布情况看（图 1-B、D），相较于实验样本，QC 样本在 PCA 图中均较集中。综上所述，实验操作与仪器条件相对稳定。

3.3 脂质代谢组学分析

3.3.1 正离子模式代谢组学分析 正离子模式下的数据经运算及处理后共获得 476 个变量，主要涉及了 381 个脂质，按出峰顺序主要含酰基肉碱 (acylcarnitine, 1~5 min)、LysoPC (2~9 min)、PC (10~16 min)、缩醛磷脂酰胆碱 (plasmenyl-PC, P-PC, 12~15 min)、SM (10~16 min)、TG 类 (18~24 min) 及胆固醇酯 (cholesteryl ester, 21~24 min) 等物质。其中正离子模式下含量最丰富的是 PC 和 TG。

3.3.2 负离子模式代谢组学分析 负离子模式下共检测到 123 个变量，即 109 个脂质成分，按出峰顺序主要含溶血磷脂酰丝氨酸 (lysophosphatidylserine, LysoPS, 1~3 min)、LysoPE (2~4 min)、脂肪酸 (FA, 2~10 min)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI, 9~11 min)、缩醛磷脂酰乙醇胺 (plasmenyl-phosphatidyl

ethanolamine, Plasmenyl-PE, 11~16 min) 等物质。其中 FA 和 PI 是负离子模式下含量最高的 2 种脂质。

3.4 非靶标代谢组学脂质代谢轮廓分析

3.4.1 正离子模式非靶标脂质代谢轮廓分析 将正离子模式得到的数据集进行 PCA 代谢轨迹分析，代谢轨迹图不仅反映了动物由于造模和药物干预导致的血清中脂质水平的变化，而且可以展示动物生理引起的变化。从正离子模式大鼠血清脂质 PCA 代谢轨迹图（图 2-A, $R^2_X=0.7$, $Q^2=0.575$ ）可以看出，对照组大鼠血清脂质代谢轨迹在 36 d 内向左上方迁移，而模型组和祖师麻片组大鼠血清脂质代谢轨迹则向右上方移动，而后也向左偏移。由此发现，给予胶原造模后，RA 大鼠的血清脂质代谢轨迹大幅度地偏离了对照组，在第 14 天发病时偏离最为明显，而后大鼠可能进入了恢复期。祖师麻片组和模型组大鼠的血清脂质代谢轨迹整体相似，都向同一方向持续变化。采用祖师麻片干预 1 周后（即第 21 天），祖师麻片组和模型组大鼠的血清脂质代谢轨迹仍较接近，干预 3 周后，2 组差异明显。结合不同时

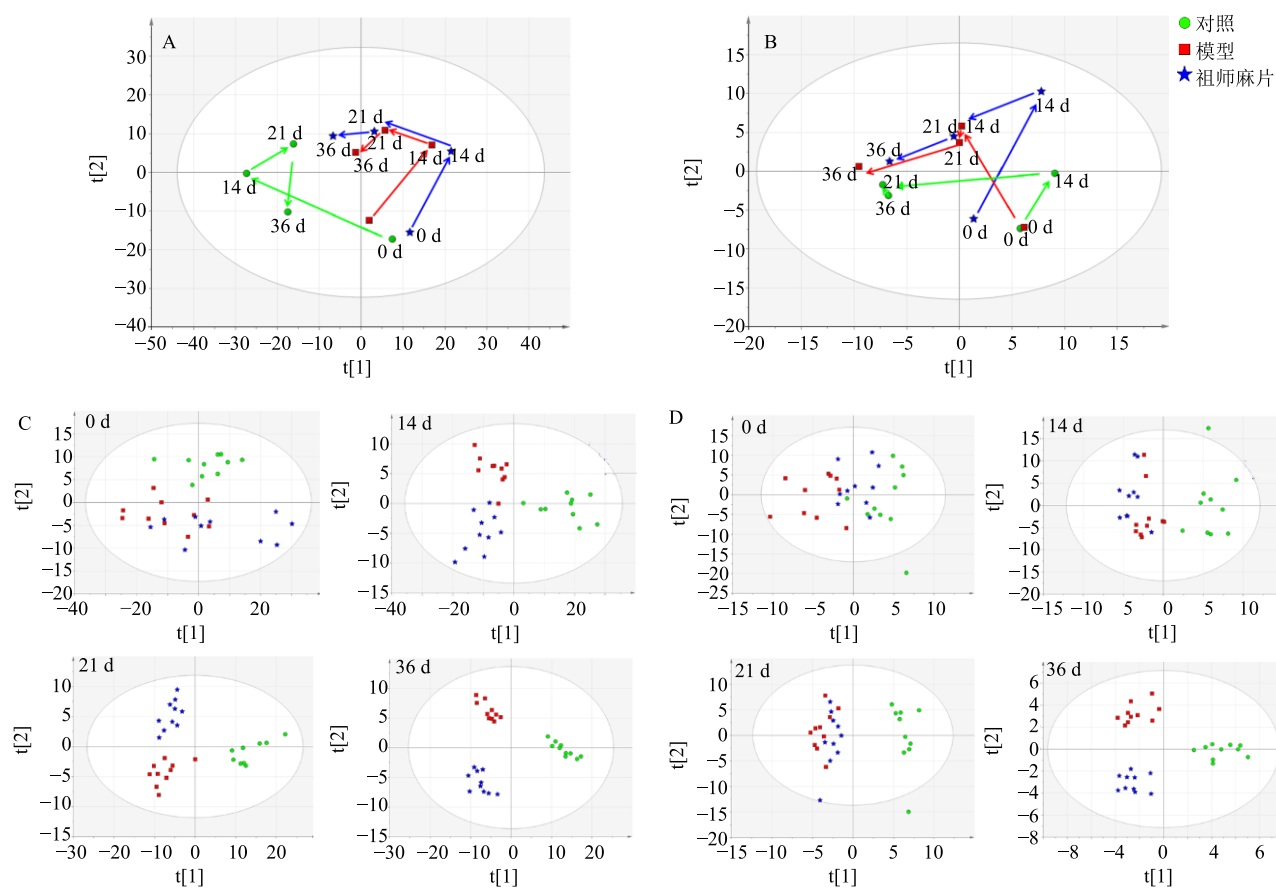


图 2 正 (A)、负 (B) 离子模式下不同时期各组大鼠血清样本代谢轨迹图及正 (C)、负 (D) 离子模式下不同时期各组大鼠血清样本 OPLS-DA 图

Fig. 2 Time-dependent trajectories of lipidomics profiles in different groups based on positive (A) and (B) negative ion mode and OPLS-DA plots at different disease periods based on positive (C) and negative (D) ion mode

间点的 OPLS-DA 图 (图 2-C) 可以发现, 3 组样本在第 36 天有很好地区分, 说明此时大鼠炎症状态持续, 且祖师麻片发挥了药效。OPLS-DA 模型参数见表 1。

3.4.2 负离子模式非靶向脂质代谢轮廓分析 负离子模式下对照组、模型组和祖师麻片组大鼠血清脂质随时间变化的 PCA 代谢轨迹图见图 2-B。从图 2-B ($R^2_X=0.826$, $Q^2=0.653$) 中可以明显观察到模型组大鼠与对照组血清脂质代谢整体趋势相似, 都向同一方向持续变化, 主要在 X 轴方向自右向左变化, 这主

要是大鼠生理引起的代谢变化。而各组在 Y 轴上的差异则主要体现了疾病引起的代谢变化。在第 14 天和第 21 天时, 模型组与对照组相距最远, 说明此时 RA 造成的代谢变化最为明显, 21 d 后模型组和祖师麻片组大鼠血清脂质代谢轨迹逐渐靠近对照组, 提示此时机体可能出现自愈。分析比较不同疾病周期的 OPLS-DA 图 (图 2-D), 在第 14 天和第 21 天时, 模型组和祖师麻片组较接近, 此时 2 组大鼠都处于疾病爆发期; 第 36 天时, 3 组样本在 OPLS-DA 图上有很

表 1 正、负离子模式血清样本不同时间点 OPLS-DA 模型参数

Table 1 OPLS-DA model parameters at different time points in serum samples based on positive and negative mode

时间点	正离子模式			负离子模式		
	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2_X	R^2_Y	Q^2
0 d	0.432	0.566	0.346	0.495	0.377	0.188
14 d	0.587	0.795	0.513	0.649	0.503	0.416
21 d	0.504	0.855	0.491	0.605	0.509	0.418
36 d	0.631	0.934	0.564	0.791	0.913	0.212

好地区分,说明此时祖师麻片发挥了药效,使得大鼠血清中脂质代谢物水平能够偏离模型组大鼠。

3.5 CIA 模型大鼠血清差异性脂质代谢物分析

3.5.1 正离子模式差异性脂质代谢物分析 采用单维统计方法,比较对照组和模型组大鼠血清中脂质代谢物的水平,选取至少在 1 d 中有差异 ($P < 0.05$ 且 $\text{fold change} > 2$) 的物质认为是疾病的差异性代谢物。结果显示,共有 201 个脂质存在差异,集中分布在第 14 天,差异性代谢物在不同时期的分布韦恩图见图 3,从图中发现有 4 个脂质在第 14、21、36 天均存在显著差异;第 14 天和第 21 天有 24 个共同存在差异的代谢物;第 14 天和第 36 天则有 32 个共同存在差异的脂质,将至少在 2 个时间点存在差异的 56 个物质挑选出来做热图分析,见图 4-A。代谢物的相关信息见表 2。

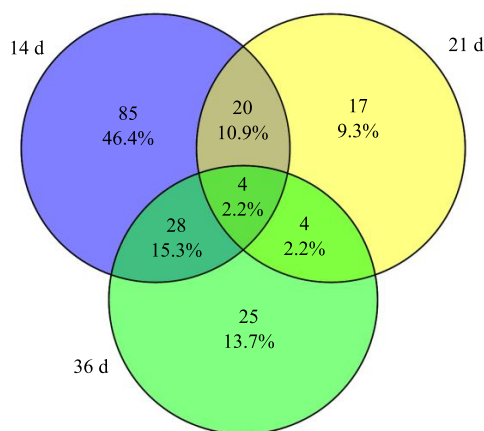


图 3 不同病程时期筛选的差异性代谢物分布韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of differential metabolites in different disease periods

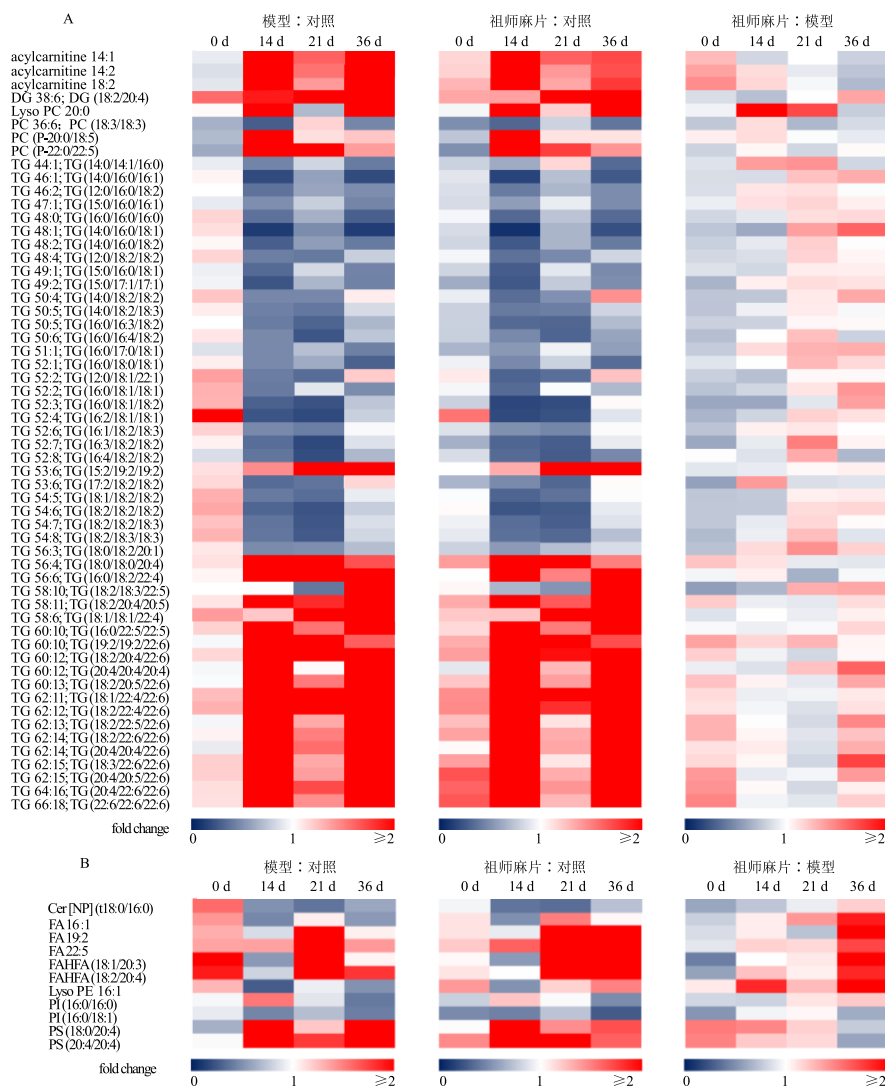


图 4 正 (A)、负 (B) 离子模式下各组大鼠血清样本中差异性脂质比较热图

Fig. 4 Heatmap of identified differential lipidomics based on positive (A) and negative (B) ion mode of each group of rats

表 2 正、负离子模式下差异性脂质化合物相关信息

Table 2 Chemical information of differential lipids based on positive and negative mode

序号	代谢物	分子式	离子形式	理论值 (<i>m/z</i>)	实际值 (<i>m/z</i>)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	<i>t_R</i> /min	差异时间/d
1	acylcarnitine 14:1	C ₂₁ H ₄₀ NO ₄	[M] ⁺	370.295 2	370.295 5	0.837 8	1.69	14、36
2	acylcarnitine 14:2	C ₂₁ H ₃₈ NO ₄	[M] ⁺	368.279 5	368.279 8	0.706 5	1.34	14、36
3	acylcarnitine 18:2	C ₂₅ H ₄₆ NO ₄	[M] ⁺	424.342 1	424.341 3	-1.981 1	2.84	14、36
4	DG 38:6; DG(18:2/20:4)	C ₄₁ H ₆₈ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	658.540 5	658.541 9	2.127 7	12.87	21、36
5	LysoPC 20:0	C ₂₈ H ₅₈ NO ₇ P	[M+H] ⁺	552.402 4	552.405 2	5.126 8	6.64	14、36
6	PC 36:6; PC(18:3/18:3)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺	778.538 1	778.539 1	1.246 8	9.32	14、36
7	Plasmenyl-PC 44:5; PC(P-22:0/22:5)	C ₅₂ H ₉₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	876.684 1	876.681 5	-2.933 8	14.98	14、21
8	TG 44:1; TG(14:0/14:1/16:0)	C ₄₇ H ₈₈ O ₆	[M+Na] ⁺	771.647 3	771.652 6	6.861 2	20.44	14、36
9	TG 46:1; TG(14:0/16:0/16:1)	C ₄₉ H ₉₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	794.723 2/799.678 6	794.723 2/799.683 0	-0.025 2/-5.494 4	21.44	14、36
10	TG 46:2; TG(12:0/16:0/18:2)	C ₄₉ H ₉₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	792.707 6/797.663 0	792.708 5/797.663 3	1.174 2/-0.426 6	20.57	14、36
11	TG 47:1; TG(15:0/16:0/16:1)	C ₅₀ H ₉₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	808.738 9/813.694 3	808.737 1/813.700 1	-2.190 6/-7.183 3	21.9	14、36
12	TG 48:0; TG(16:0/16:0/16:0)	C ₅₁ H ₉₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	824.770 2	824.774 4	5.133 5	23.17	14、36
13	TG 48:1; TG(14:0/16:0/18:1)	C ₅₁ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	822.754 5	822.756 4	2.287 1	22.34	14、36
14	TG 48:2; TG(14:0/16:0/18:2)	C ₅₁ H ₉₄ O ₆	[M+Na] ⁺	825.694 3	825.696 5	2.715 2	21.54	14、36
15	TG 48:4; TG(12:0/18:2/18:2)	C ₅₁ H ₉₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	816.707 6/821.663 0	816.714 4/821.662 3	8.370 1/0.803 9	19.74	14、21
16	TG 49:1; TG(15:0/16:0/18:1)	C ₅₂ H ₉₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	836.770 2	836.775 6	6.4952	22.76	14、36
17	TG 49:2; TG(15:0/17:1/17:1)	C ₅₂ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	839.709 9	839.710 8	1.0608	21.89	14、36
18	TG 50:4; TG(14:0/18:2/18:2)	C ₅₃ H ₉₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	844.738 9/849.694 3	844.740 8/849.698 7	2.286 7/-5.229 7	20.76	14、21
19	TG 50:5; TG(14:0/18:2/18:3)	C ₅₃ H ₉₂ O ₆	[M+Na] ⁺	847.678 6	847.682 1	4.1204	19.99	14、21
20	TG 50:5; TG(16:0/16:3/18:2)	C ₅₃ H ₉₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	842.723 2	842.719 4	-4.5368	20.18	14、21
21	TG 50:6; TG(16:0/16:4/18:2)	C ₅₃ H ₉₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	840.707 6/845.663 0	840.704 4/845.661 9	-3.773 8/1.254 4	19.5	14、21
22	TG 51:1; TG(16:0/17:0/18:1)	C ₅₄ H ₁₀₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	864.801 5	864.801 3	-0.196 8	23.42	14、36
23	TG 52:1; TG(16:0/18:0/18:1)	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	878.817 1/883.772 5	878.814 4/883.776 2	-3.097 9/-4.178 9	23.92	14、36
24	TG 52:2; TG(12:0/18:1/22:1)	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	881.756 9	881.760 6	4.245 2	21.73	14、21
25	TG 52:2; TG(16:0/18:1/18:1)	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	876.801 5	876.803 6	2.431 5	23.18	14、36
26	TG 52:3; TG(16:0/18:1/18:2)	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	[M+Na] ⁺	879.741 2	879.739 4	-2.059 2	20.94	14、21
27	TG 52:4; TG(16:2/18:1/18:1)	C ₅₅ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	877.725 6	877.728 1	2.896 2	20.19	14、21
28	TG 52:6; TG(16:1/18:2/18:3)	C ₅₅ H ₉₄ O ₆	[M+Na] ⁺	873.694 3	873.697 3	3.482 2	20.05	14、21
29	TG 52:7; TG(16:3/18:2/18:2)	C ₅₅ H ₉₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	866.723 2	866.722 4	-0.946 9	19.33	14、21
30	TG 52:8; TG(16:4/18:2/18:2)	C ₅₅ H ₉₀ O ₆	[M+Na] ⁺	869.663 0	869.669 0	6.950 5	18.62	14、21
31	TG 53:6; TG(15:2/19:2/19:2)	C ₅₆ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	887.709 9	887.713 7	4.272 8	20.95	21、36
32	TG 53:6; TG(17:2/18:2/18:2)	C ₅₆ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	887.709 9	887.713 6	4.160 1	20.50	14、21
33	TG 54:5; TG(18:1/18:2/18:2)	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	898.785 8	898.790 1	4.766 1	21.73	14、21
34	TG 54:6; TG(18:2/18:2/18:2)	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	896.770 2	896.774 8	5.167 4	20.94	14、21
35	TG 54:7; TG(18:2/18:2/18:3)	C ₅₇ H ₉₆ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	894.754 5	894.754 0	-0.581 7	20.19	14、21
36	TG 54:8; TG(18:2/18:3/18:3)	C ₅₇ H ₉₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺ /[M+Na] ⁺	892.738 8/897.694 3	892.738 0/897.691 8	-0.975 3/2.742 5	19.40	14、21
37	TG 56:3; TG(18:0/18:2/20:1)	C ₅₉ H ₁₀₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	930.848 4	930.851 6	3.419 4	23.95	14、21
38	TG 56:4; TG(18:0/18:0/20:4)	C ₅₉ H ₁₀₆ O ₆	[M+Na] ⁺	933.788 2	933.793 8	6.045 0	23.83	14、21
39	TG 56:6; TG(16:0/18:2/22:4)	C ₅₉ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	929.756 9	929.761 2	4.671 7	22.28	14、21、

续表 2

序号	代谢物	分子式	离子形式	理论值 (<i>m/z</i>)	实际值 (<i>m/z</i>)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	<i>t_R</i> /min	差异时间 点/d
40	TG 58:10; TG(18:2/18:3/22:5)	C ₆₁ H ₉₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	944.770 2	944.768 9	-1.345 3	19.88	21、36
41	TG 58:11; TG(18:2/20:4/20:5)	C ₆₁ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	947.709 9	947.708 9	-1.066 5	19.60	14、36
42	TG 58:6; TG(18:1/18:1/22:4)	C ₆₁ H ₁₀₆ O ₆	[M+Na] ⁺	957.788 2	957.788 6	0.459 8	22.83	21、36
43	TG 60:10; TG(16:0/22:5/22:5)	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	977.756 9	977.759 8	3.009 2	21.15	14、36
44	TG 60:10; TG(19:2/19:2/22:6)	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	977.756 9	977.749 9	-7.123 8	21.73	14、21
45	TG 60:12; TG(18:2/20:4/22:6)	C ₆₃ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	973.725 6	973.729 1	3.638 2	19.95	14、21、36
46	TG 60:12; TG(20:4/20:4/20:4)	C ₆₃ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	973.725 6	973.726 9	1.377 2	19.61	14、36
47	TG 60:13; TG(18:2/20:5/22:6)	C ₆₃ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	971.709 9	971.715 0	5.242 0	19.20	14、36
48	TG 62:11; TG(18:1/22:4/22:6)	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₆	[M+Na] ⁺	1 003.772 5	1 003.770 4	-2.103 7	21.47	14、21、36
49	TG 62:12; TG(18:2/22:4/22:6)	C ₆₅ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	1 001.756 9	1 001.753 4	-3.456 5	20.68	14、21、36
50	TG 62:13; TG(18:2/22:5/22:6)	C ₆₅ H ₁₀₀ O ₆	[M+Na] ⁺	999.741 2	999.740 3	-0.910 9	19.96	14、36
51	TG 62:14; TG(18:2/22:6/22:6)	C ₆₅ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	997.725 6	997.722 1	-3.470 4	19.55	14、36
52	TG 62:14; TG(20:4/20:4/22:6)	C ₆₅ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	997.725 6	997.734 6	9.067 2	19.56	14、36
53	TG 62:15; TG(18:3/22:6/22:6)	C ₆₅ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	995.709 9	995.703 6	-6.341 7	18.74	14、36
54	TG 62:15; TG(20:4/20:5/22:6)	C ₆₅ H ₉₆ O ₆	[M+Na] ⁺	995.709 9	995.704 8	-5.135 7	18.88	14、36
55	TG 64:16; TG(20:4/22:6/22:6)	C ₆₇ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	1 021.725 6	1 021.724 4	-1.136 1	19.24	14、36
56	TG 66:18; TG(22:6/22:6/22:6)	C ₆₉ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	1 045.725 6	1 045.725 0	-0.535 9	18.85	14、36
57	Cer [NP] 34:0; Cer [NP](t18:0/16:0)	C ₃₄ H ₆₉ NO ₄	[M-H] ⁻	554.514 3	554.518 1	6.877 3	12.12	21
58	FA 16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	253.216 2	253.218 0	7.075 1	3.63	14
59	FA 19:2	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	293.247 5	293.248 5	3.378 8	5.23	21
60	FA 22:5	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	329.247 5	329.248 3	2.401 2	4.42	21
61	FAHFA 38:4; FAHFA(18:1/20:3)	C ₃₈ H ₆₆ O ₄	[M-H] ⁻	585.487 7	585.487 2	-0.923 1	5.80	21
62	FAHFA 38:6; FAHFA(18:2/20:4)	C ₃₈ H ₆₂ O ₄	[M-H] ⁻	581.456 4	581.457 3	1.480 2	4.24	21
63	LysoPE 16:1	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	[M-H] ⁻	450.261 5	450.263 7	4.844 4	2.25	14
64	PI 32:0; PI(16:0/16:0)	C ₄₁ H ₇₉ O ₁₃ P	[M-H] ⁻	809.517 5	809.514 5	-3.658 8	10.24	36
65	PI 34:1; PI(16:0/18:1)	C ₄₃ H ₈₁ O ₁₃ P	[M-H] ⁻	835.533 1	835.530 5	-3.125 7	10.41	14、36
66	PS 38:4; PS(18:0/20:4)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻	810.528 0	810.532 2	5.234 6	11.00	14
67	PS 40:8; PS(20:4/20:4)	C ₄₆ H ₇₄ NO ₁₀ P	[M-H] ⁻	830.496 7	830.501 0	5.228 9	8.79	14

从图 4-A 可以看出, 几乎所有 acylcarnitine 和 Plasmeyl-PC 的含量在模型组中呈现上调趋势。同时, TG 类物质的上下调趋势也呈现一定的规律, TG 碳链中碳原子个数小于 58 的 TG 的含量在模型组中呈现下调趋势, 碳原子个数大于 58 的 TG 类物质在模型组中含量则明显高于对照组。

在所有差异性代谢物中, 有 4 个脂质成分含量在模型组和对照组中一直存在统计学差异, 即 TG (16:0/18:2/22:4)、TG (18:2/20:4/22:6)、TG (18:1/22:4/22:6) 和 TG (18:2/22:4/22:6)。TG 主要组分为极低密度脂蛋白和乳糜微粒。与对照组比较, 模型组大鼠血清中这 4 个 TG 一直保持较高水平, 祖师麻片

能显著下调 TG (16:0/18:2/22:4) 的水平。

饱和 PC [如 PC (14:0/16:0), PC (16:0/16:0)] 在模型组中均呈现上调趋势, 而单不饱和 PC [如 PC (16:0/16:1)] 和多不饱和 PC [PC (18:2/20:2)] 则有不同的上下调变化, 见图 5。

3.5.2 负离子模式差异性脂质及代谢通路分析 相较于正离子模式找出的差异性物质, 负离子模式中筛选得到的差异性物质较少, 主要有 FA、LysoPE、PS、PI 和 Cer [NP], 将筛选得到的差异性物质计算在不同时间点时组间两两比较的 fold change 值做热图分析, 见图 4-B。代谢物的相关信息见表 2。

从热图中发现, 除 FA 16:1 外, 其余脂肪酸在

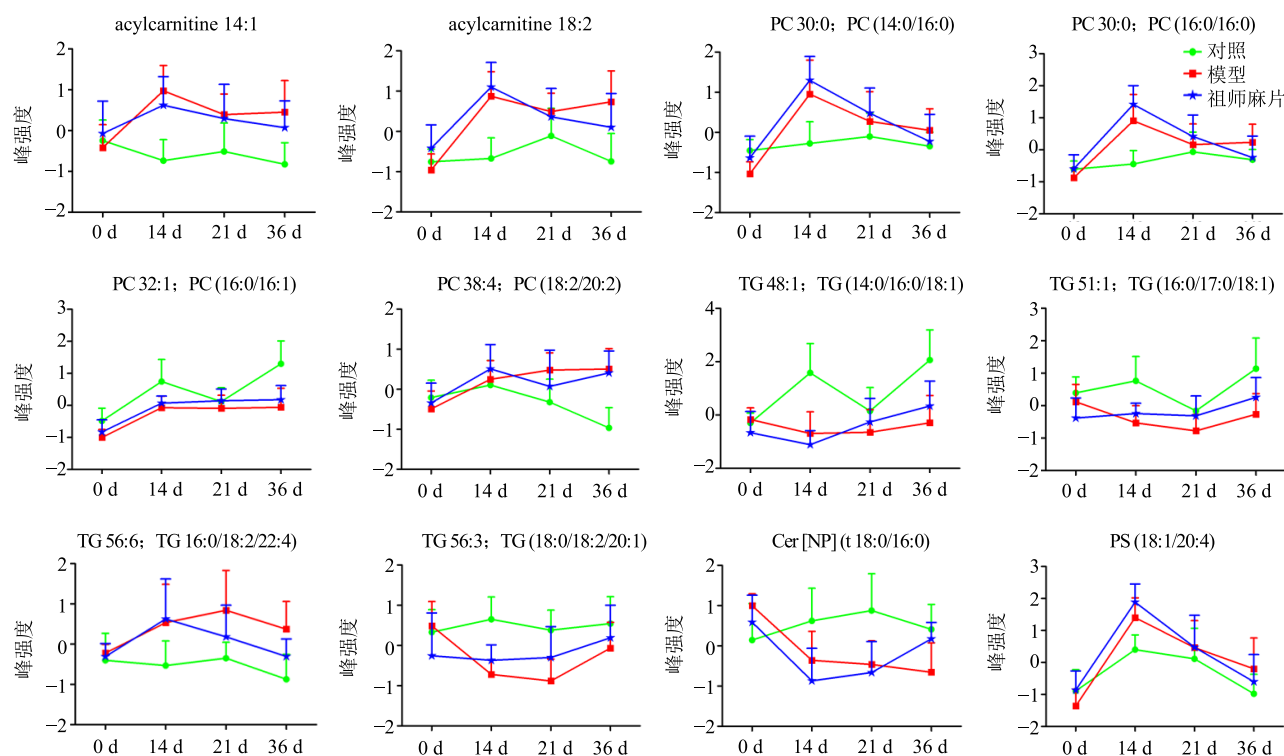


图5 各组差异性代谢物含量在疾病不同时期的趋势变化

Fig. 5 Changes of differential metabolites content in different phases of diseases

RA 大鼠中都呈现上调趋势；祖师麻片对 Cer [NP] (t18:0/16:0)、PS (18:0/20:4) 有较好的调控作用，见图4。

4 讨论

本实验研究结果发现，与对照组比较，模型组大鼠血清中 PC (18:3/18:3)、PS (20:4/20:4) 和 PS (18:0/20:4) 等多个不饱和磷脂的含量有显著变化。磷脂代谢轮廓的改变提示了 RA 机体或存在氧化应激状态。活性氧 (ROS) 是机体有氧代谢过程中的产物，在 RA 发病中起重要作用，RA 患者滑膜液和外周血中有高浓度的 ROS，它们通过不成对的自由基氧化各种细胞及细胞外部分，破坏大分子并加剧炎症，而 ROS 的主要靶标就是膜磷脂中多不饱和脂肪酸的双键，从而使细胞膜的流动性和渗透性发生变化，最终导致细胞结构和功能的变化^[18]。

研究发现，RA 患者常常伴有动脉粥样硬化等心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD)^[19]，此现象提示血脂代谢异常已经成为 RA 发病的一个重要特征。有研究证实，RA 引发脂质代谢紊乱是通过滑膜和关节周围组织炎症，释放炎症因子进入血液循环从而导致血脂代谢紊乱、氧化应激损伤等^[20]。

FA (16:1) 是棕榈油酸，其在模型组中呈现下

调趋势。棕榈油酸和棕榈醇是不饱和脂肪酸代谢的中间体，脂肪酸分解代谢后经糖酵解和有氧化供能，也可转变成糖脂肪酸与血清蛋白结合转运入各组织经 β -氧化供能^[21]。PI (16:0/18:1) 在第 14 天和第 36 天均被鉴定为差异性物质，且在模型组均呈现下调趋势。在动物组织中，PI 是通过酶磷脂酶 A2 的作用生物合成类二十烷酸（包括前列腺素）所需的花生四烯酸的主要来源^[22]。

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的血清代谢组学研究发现，正、负离子模式下的代谢轮廓不一致，这是由于正、负离子模式检测到的物质种类不一样。正离子模式下，关注的是 PC、PE、TG 类物质，这类物质主要在 RA 发病初期（第 14 天）出现代谢异常，而负离子模式下主要检测的是脂肪酸类物质，这类物质在发病中期（第 21 天）代谢异常最为明显。根据此实验结果，结合临床现象推测，RA 疾病引发机体血脂代谢异常是诱发心血管并发症的一个重要因素，祖师麻片对少数差异性脂质有调控作用。

参考文献

- [1] Gross R W, Han X. Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology [J]. *Chem Biol*,

- 2011, 18(3): 284-291.
- [2] 杨 丽, 白 玉, 刘虎威. 脂质组学分析方法及其临床应用 [J]. 沈阳医学院学报, 2017, 19(1): 1-5.
- [3] Chen C, Shah Y M, Morimura K, *et al.* Metabolomics reveals that hepatic stearyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis [J]. *Cell Metabol*, 2008, 7(2): 135-147.
- [4] Jonasdottir H S, Brouwers H, Kwekkeboom J C, *et al.* Targeted lipidomics reveals activation of resolution pathways in knee osteoarthritis in humans [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(7): 1150-1160.
- [5] Chen X, Chen H, Dai M, *et al.* Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36622-36631.
- [6] Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis [J]. *Am J Med*, 2008, 121(Suppl 1): 21-31.
- [7] Navarro-Millan I, Yang S, DuVall S L, *et al.* Association of hyperlipidaemia, inflammation and serological status and coronary heart disease among patients with rheumatoid arthritis: Data from the national veterans health administration [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(2): 341-347.
- [8] 邓敏婕. 类风湿性关节炎患者血脂变化分析 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [9] 李书慧, 吴立军, 殷红英. 祖师麻化学和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 4-6.
- [10] 王 鹏, 刘金平, 詹 妮, 等. 祖师麻化学成分和药理活性研究新进展 [J]. 特产研究, 2011, 33(4): 73-76.
- [11] 杨鸽华, 王丽丽, 封 玲, 等. 祖师麻总香豆素的抗炎镇痛药效作用评价 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5): 1183-1185.
- [12] 李 伟, 康阿龙, 张琳静. 祖师麻总香酮镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2012, 33(1): 1-3.
- [13] 张 立, 喻文进, 刘慧琼, 等. 西瑞香素抗炎抗菌作用的初步实验研究 [J]. 中医药导报, 2012, 18(6): 72-73.
- [14] 王洁莹, 刘 玮, 郑 茂, 等. 瑞香素对 CIA 大鼠脾 T 淋巴细胞杀瘤效应的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 33-35.
- [15] Cajka T, Smilowitz J T, Fiehn O. Validating quantitative untargeted lipidomics across nine liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry platforms [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12360-12368.
- [16] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, *et al.* MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. *Nat Method*, 2015, 12(6): 523-526.
- [17] DeFelice B C, Mehta S S, Samra S, *et al.* Mass spectral feature list optimizer (MS-FLO): A tool to minimize false positive peak reports in untargeted liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) data processing [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(6): 3250-3255.
- [18] Gu Y, Lu C, Zha Q, *et al.* Plasma metabonomics study of rheumatoid arthritis and its Chinese medicine subtypes by using liquid chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(5): 1535-1543.
- [19] 潘洁莉, 胡长锋, 韦双双, 等. 基于鸟枪法脂质组学研究环氧酶-2 抑制剂对关节炎模型血清脂代谢的干预作用 [J]. 色谱, 2016, 34(6): 550-557.
- [20] Dessein P H, Joffe B I, Stanwix A E. Inflammation, insulin resistance, and aberrant lipid metabolism as cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(7): 1403-1405.
- [21] Yang D, Wang X, Wu Y, *et al.* Urinary metabolomic profiling reveals the effect of Shenfu Decoction on chronic heart failure in rats [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 11915-11929.
- [22] Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains [J]. *Science*, 2003, 300(5618): 445-452.