

高脂血症与血清游离脂肪酸含量的相关性及辛伐他汀的干预作用

黄家欣^{1a}, 黄荣增^{1a}, 张丽君^{1b}, 宋成武^{1a}, 尹久², 金姝娜^{1b*} (1.湖北中医药大学, a.药学院, b.基础医学院, 武汉 430065; 2.宜昌市东阳光实业发展有限公司, 湖北 宜昌 443300)

摘要: 目的 利用气相色谱质谱联用技术(GC-MS)建立并验证血清中游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)的定量分析方法, 研究血清 FFAs 含量与高脂血症之间的相关性及辛伐他汀对其的干预作用。方法 采用衍生化方法对血清样品进行甲酯化前处理; 高脂饲料诱发高脂血症动物模型, 辛伐他汀干预给药 4 周; 利用 GC-MS 建立血清 FFAs 含量的分析方法并测定各组小鼠血清 FFAs 含量。结果 成功建立并验证 GC-MS 测量血清 FFAs 含量的分析方法, 结果发现高脂血症小鼠血清中辛酸、十三烷酸、亚油酸等 19 个 FFAs 含量显著变化, 且辛伐他汀对其中的 14 个 FFAs 具有显著的改善作用。结论 血清中 FFAs 含量与高脂血症密切相关, 辛伐他汀对血清 FFAs 含量具有显著的改善作用, 可为脂代谢相关疾病的早期检测和预后评估提供科学依据。

关键词: 游离脂肪酸; 高脂血症; 辛伐他汀; 气相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)06-0743-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20213258

引用本文: 黄家欣, 黄荣增, 张丽君, 等. 高脂血症与血清游离脂肪酸含量的相关性及辛伐他汀的干预作用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 743-750.

Correlation Between Hyperlipidemia and the Concentration of Free Fatty Acids in Serum and the Intervention Effect of Simvastatin

HUANG Jiabin^{1a}, HUANG Rongzeng^{1a}, ZHANG Lijun^{1b}, SONG Chengwu^{1a}, YIN Jiu², JIN Shuna^{1b*} (1.Hubei University of Chinese Medicine, a.College of Pharmacy, b.College of Basic Medicine, Wuhan 430065, China; 2.Yichang Dongyangguang Industrial Development Co., Ltd., Yichang 443300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the present study of a quantitative analysis method to determine the concentration of free fatty acids(FFAs) in serum by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS). To investigate the correlation between the FFAs levels and hyperlipidemia in serum and the intervention effect of simvastatin. **METHODS** Derivatization was used to obtain methyl product. High-fat diet was used to induce hyperlipidemia animal model. The positive group was treated with simvastatin for four weeks. Meanwhile, the analysis method of serum FFAs was established by GC-MS to obtain the concentration of FFAs. **RESULTS** The GC-MS method was successfully established and validated for measuring the concentration of FFAs in serum. The results found that the nineteen FFAs were detected in serum of animals, such as caprylic acid, tridecyl acid, linoleic acid, etc. Simvastatin had a significant improvement effect on fourteen serum FFAs. **CONCLUSION** The content of FFAs in the serum is closely related to hyperlipidemia. Simvastatin can significantly ameliorate the distribution condition serum FFAs, which can provide a scientific basis for the early detection and prognosis evaluation of lipid metabolism-related diseases.

KEYWORDS: free fat acids; hyperlipoidemia; simvastatin; GC-MS

脂质代谢紊乱会导致相关器官的病理性变化, 诱发高脂血症、肥胖症、脂肪肝等疾病^[1]。脂质代谢异常, 通常也会增加心血管疾病、II型糖尿病的患病风险^[2]。研究表明, 与正常人群血清游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)含量相比, 脂质代谢综合征患者潜在的生物标记物棕榈油酸(C16:1 n-9c), 二十碳烯酸(C20:1 n-9c), 二十二碳烯酸(C22:4 n-6c)含量更高^[3]。相关报道中明确指出动脉

粥样硬化与脂质代谢紊乱密切相关, 尤其是 FFAs 的新陈代谢, 诱发血中 FFAs 水平的显著上升, 从而增加脂质沉积, 加重病程发展^[4]。

气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)是一种高效的检测技术, 特别适用于生物样本中一些疾病代谢产物和血清中脂肪酸的信息分析^[5]。本研究拟建立一个可靠且灵敏的 FFAs 检测方案, 探讨正常、高脂模型、给药组小鼠血清中 FFAs 含量的显著性

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703243)

作者简介: 黄家欣, 女, 硕士生 E-mail: Rachel_888@163.com

*通信作者: 金姝娜, 女, 博士, 副研究员 E-mail: nanajin24@aliyun.com

差异,进而研究各种 FFAs 与高脂血症的关系,探讨降血脂药物辛伐他汀对血清 FFAs 的改善作用,为脂代谢相关疾病的早期检测和预后评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

色谱: G3440B 7890BGC 气相色谱仪(美国 Agilent),配 G3903-63011 的脂肪酸专用毛细管柱 DB-FastFAME(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)。GC-MS 四极杆串联质谱仪,配备电子轰击离子源(EI)(美国 Agilent); 30048884 酶标仪(瑞士 Tecan); KDC-140HR 高速冷冻离心机(安徽中佳科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

37 种脂肪酸甲酯(fatty acid methyl ester, FAMES)混合对照品(上海安谱实验科技股份有限公司,批号: K6270200;规格: 25 mg;含量>99%);十九碳烯酸甲酯对照品(内标,美国 Nu-Chek-Prep, Inc 公司,批号: U-54M-JY9-Y;含量>99%;规格: 1 mL);甲醇(色谱级,批号: M158-4;规格: 4 L)、正己烷(色谱级批号: 110-54-3;规格: 1 L)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;生理盐水(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司,批号: 200903902;规格: 500 mL)、氢氧化钾(分析纯,批号: 20180105;规格: 500 g)、无水硫酸钠(分析纯,批号: 20150212;规格: 500 g)均购于国药集团化学试剂有限公司;硫酸(分析纯 Ghemical Reagent 公司;批号: 2010715;规格: 500 mL)。

1.3 动物

SPF 级昆明小鼠 18 只[♂, 体质量(22±3.0)g], SPF 级 3 周龄金黄地鼠 15 只[♂, 体质量(90±5.0)g], 购自武汉生物制品研究所有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK(鄂)2017-0013。本实验中每组动物分笼饲养,自由饮水(娃哈哈集团有限公司),SPF 维持饲料[辽宁长生生物技术有限公司,实验动物饲料生产许可证: SCXK(辽)2015-0003]。

实验动物随机分为正常组、模型组、给药组,昆明小鼠每组 6 只,金黄地鼠每组 5 只。模型组和给药组给予高脂饲料(含 78.8%的正常饲料、10%猪油、1%胆固醇、0.2%胆酸盐),其中给药组按体质量灌胃给药辛伐他汀;正常组给予普通维持饲料,灌胃等体积生理盐水。给药 28 d 后,禁食 6 h,腹膜内注射 0.03 g·kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉,摘眼球取

血,移至不含抗凝剂无菌管中,于 4℃静置 30 min,802×g 离心 15 min 分离血清,-80℃保存备用。参考前期课题组已发表文献[6],血清总胆固醇经 t 检验表明 3 组间差异有统计学意义,证明造模成功。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 流动相: 氦气(纯度: 99.99%);流速: 1.0 mL·min⁻¹;进样口温度: 250℃;分流比: 1:1;进样量: 2 μL;程序升温: 起始温度 50℃,维持 0.5 min,然后以 30℃·min⁻¹速度上升至 194℃,维持 3.5 min,最后以 5℃·min⁻¹的速度上升至 240℃,保持 1 min。

1.4.2 质谱条件 MS 喷射电压 70 eV;离子源温度 230℃;四极杆温度 150℃;MSD 传输线温度 250℃。溶剂延迟 2.9 min;扫描模式为全扫离子扫描联合数据处理选择性离子扫描,范围 35~450 m/z。

1.4.3 样品处理 脂肪酸衍生化方法采用酸法酯化,基于文献[7]方法改进: ①混合血清 50 μL 加入内标 50 μL(0.02 mg·mL⁻¹ 十九碳烯酸甲酯/正己烷),至 2 mL 玻璃管中;②加 0.5 mL 0.4 mol·L⁻¹ KOH/CH₃OH,涡旋 3 s,室温放置 10 min;③移去正己烷中含已酯化 FAMES 一相: 加 0.5 mL 正己烷,涡旋 30 s,放置 10 min,去除上层正己烷相,重复 1 次;④酸法酯化: 剩余血清相加少量无水 Na₂SO₄ 去除水分,加 0.5 mL 5% H₂SO₄/CH₃OH,涡旋 1 min,70℃水浴加热 30 min;⑤取正己烷中游离 FAMES: 加 1 mL 正己烷,涡旋 30 s,放置 10 min,取上层正己烷相至 2 mL EP 管中,重复 1 次;⑥将 EP 管加热至 30℃氮吹干燥;⑦取 100 μL 正己烷至干燥 EP 管中复溶,12 830×g 离心 10 min 后,取 80 μL 至进样瓶中。

1.5 储备液配制

FAMES 储备液制备: 正己烷制备 65.00 μg·mL⁻¹ FAMES 对照品母液,稀释成 2.00 μg·mL⁻¹ 储备液备用; (内标)十九碳烯酸甲酯工作液制备: 以正己烷为溶剂制备 100.0 mg·mL⁻¹ 母液,稀释成 0.1 mg·mL⁻¹ 工作液备用。

1.6 数据处理方法

使用 Agilent 公司 Quantitative Analysis MassHunter Workstation Software 版本 B.09.00 软件建立各个化合物的标准曲线方程,带入样品数据,得到各个 FAMES 浓度,计算血清中 FFAs 含

量。所有数据采用 GraphPad Prism 7.00 进行 *t* 检验显著性统计分析; 相关系数采用各个 FFAs 含量与总胆固醇进行构建, 通过 SIMCA-P 14.1 进行计算。

2 结果

2.1 血清脂肪酸的分析方法的验证

2.1.1 标准曲线、定量下限 精密吸取 FAMES 母液 $65.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 配置成 $2.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储备液, 与 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 十九烯酸甲酯工作液用正己烷稀释, 配制成浓度为 1 000, 500, 200, 100, 25, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, $0.1\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液(十九烯酸甲酯的终浓度均为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 化合物总离子流图见图 1。化合物线性回归方程结果显示, *r* 值范围 0.992 0~0.998 8, 所有化合物定量下限信噪比均 >5 , 定量下限范围为 $0.50\sim5.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 检出限范围为 $0.25\sim2.50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 见表 1。

表 1 目标化合物的线性信息

Tab. 1 Linearity information of target compound

编号	化合物名称	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	质荷比 (<i>m/z</i>)
1	己酸	$y=363.55x-320.72$	0.998 7	5~1 000	74
2	辛酸	$y=478.31x-40.74$	0.998 7	0.5~500	74
3	癸酸	$y=467.28x+99.88$	0.995 5	1~1 000	74
4	十一烷酸	$y=469.51x-193.62$	0.997 2	1~1 000	74
5	十二烷酸	$y=465.53x+267.88$	0.998 3	1~1 000	74
6	十三烷酸	$y=404.00x-61.94$	0.994 6	0.5~500	74
7	十四碳烯酸	$y=150.28x-136.25$	0.998 8	5~1 000	55
8	十五烷酸	$y=362.54x-26.57$	0.994 8	0.5~500	74
9	十五碳烯酸	$y=155.50x+359.64$	0.998 0	0.5~500	55
10	十七烷酸	$y=374.71x+149.26$	0.997 0	1~1 000	74
11	十七碳烯酸	$y=126.03x+174.03$	0.994 3	5~1 000	55
12	十八碳二烯酸	$y=133.37x-70.46$	0.994 7	2~1 000	67
13	γ -亚麻酸	$y=125.79x+158.97$	0.995 5	1~1 000	79
14	α -亚麻酸	$y=164.53x+118.09$	0.996 5	2~1 000	79
15	二十烷酸	$y=291.79x-171.85$	0.993 9	1~1 000	74
16	二十碳烯酸	$y=116.55x+272.85$	0.996 3	2~1 000	55
17	二十碳二烯酸	$y=119.07x-56.23$	0.995 0	2~1 000	67
18	二十一烷酸	$y=295.08x-377.92$	0.993 8	2~1 000	74
19	二十碳三烯酸	$y=151.91x-387.58$	0.996 0	5~1 000	79
20	山嵛酸	$y=141.09x-112.85$	0.995 2	2~1 000	74
21	二十碳五烯酸	$y=280.37x-194.89$	0.995 5	1~1 000	79
22	二十二碳烯酸	$y=112.35x-144.00$	0.996 9	2~1 000	55
23	二十二碳二烯酸	$y=119.06x-209.15$	0.995 3	5~1 000	67
24	二十三烷酸	$y=273.40x+12.83$	0.995 7	2~1 000	74
25	木蜡酸	$y=237.10x+192.30$	0.996 2	2~1 000	74
26	神经酸	$y=123.31x+74.49$	0.992 0	1~1 000	55

2.1.2 日内、日间精密度的 日内精密度: 取生理盐水平行 21 份, 按“1.4.3”项下方法操作, 氮吹后, 分别用 $100\ \mu\text{L}$ 高、中、低 3 个浓度即 100, 25, $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照溶液(每个浓度 6 份)复溶, 随行空白样品 3 份($100\ \mu\text{L}$ 正己烷复溶), 同一色谱条件下, 同 1 d 内测定。日间精密度: 取生理盐水平行 3 份, 按照“1.4.3”项下方法操作, 氮吹后, 分别用 $100\ \mu\text{L}$ 高、中、低 3 个浓度即 100, 25, $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照溶液(每个浓度 3 份)复溶, 随行空白样品 3 份($100\ \mu\text{L}$ 正己烷复溶), 同一色谱条件下, 连续测定 3 d, 每天平行上述步骤制备样品(即空白组及各个浓度组有 9 组数据进行日间比较)。结果表明其日内、日间精密度 $\text{RSD}\leq 14.82\%(<15\%)$, 符合生物样品验证标准。结果见表 2。

表 2 目标化合物在高、中、低浓度对照溶液的日内($n=6$)、日间(3 d, $n=9$)精密度和准确度结果

Tab. 2 Intra-day($n=6$), inter-day(3 d, $n=9$) accuracy results of high, medium, low concentration of the target compounds %

编号	低浓度($5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)		中浓度($25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)		高浓度($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	日内精密度	日间精密度	日内精密度	日间精密度	日内精密度	日间精密度
1	1.21	14.56	0.98	6.04	0.52	6.21
2	3.93	5.72	1.16	8.51	1.55	5.89
3	4.75	14.82	1.28	3.23	0.61	5.92
4	3.45	9.89	1.39	4.77	1.26	6.92
5	9.41	7.92	3.41	13.99	1.82	5.81
6	0.63	7.54	0.81	7.91	0.87	3.85
7	1.30	3.68	0.62	6.82	1.56	7.25
8	0.66	4.57	2.08	4.03	2.99	10.84
9	1.54	9.02	0.89	6.80	1.45	3.02
10	0.91	4.30	1.00	9.34	2.92	13.85
11	0.88	9.56	1.04	12.94	1.79	7.67
12	6.61	6.51	3.45	9.43	2.35	4.69
13	2.43	4.43	4.35	12.29	2.10	2.35
14	4.24	4.16	4.94	12.81	1.52	7.28
15	0.86	7.85	0.72	5.27	2.35	8.84
16	1.23	6.82	1.23	6.87	4.18	10.46
17	0.93	1.48	1.38	10.11	3.53	5.73
18	3.75	14.24	1.79	12.69	2.45	6.00
19	3.15	1.27	2.11	2.51	1.07	5.81
20	2.90	7.94	2.89	5.58	0.67	5.94
21	13.24	5.73	2.01	5.56	2.34	4.53
22	2.38	6.42	0.12	6.23	0.23	5.44
23	3.62	3.35	1.57	12.84	2.72	2.93
24	1.25	7.47	2.13	7.03	2.66	5.90
25	1.79	2.15	1.02	10.01	1.07	5.82
26	2.12	2.08	2.06	13.21	11.63	13.06

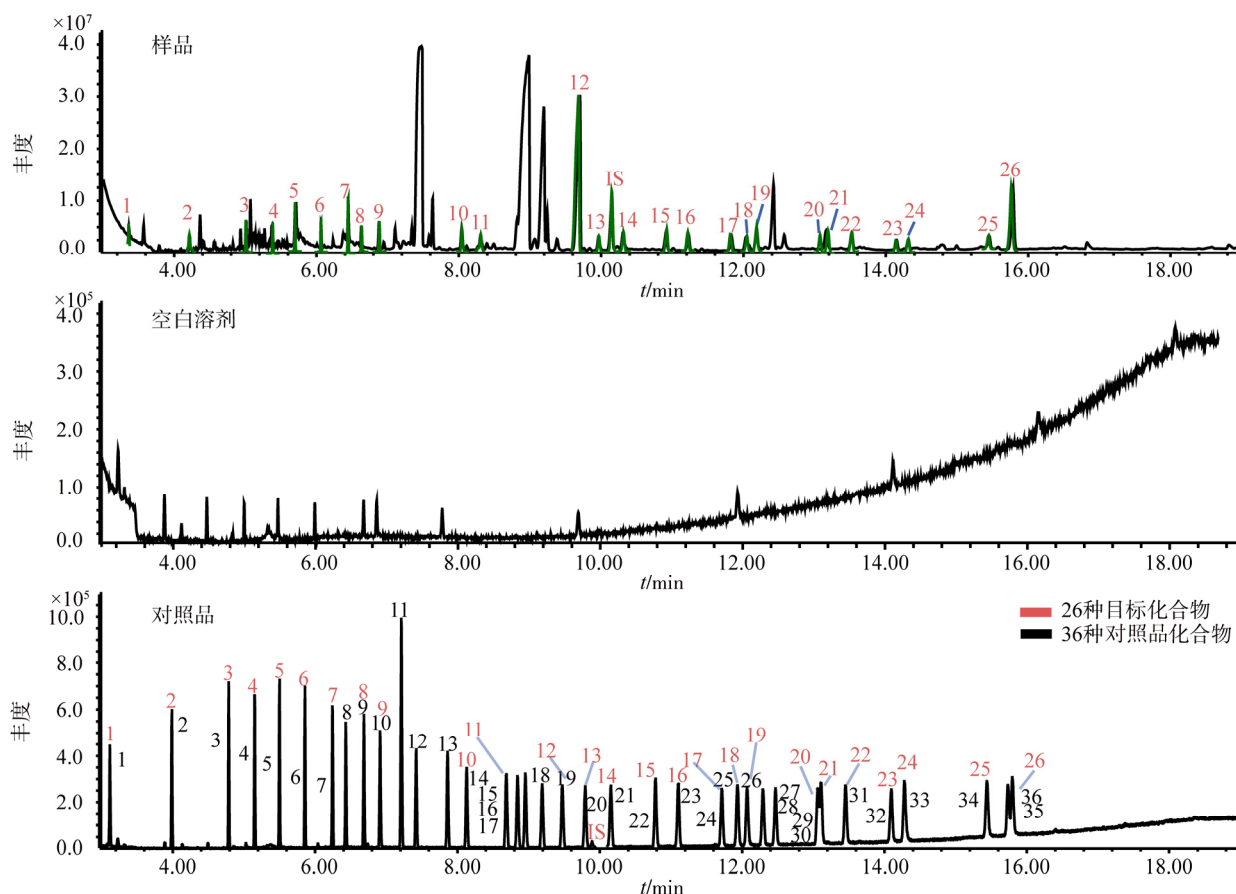


图1 样品、空白溶剂、目标化合物对照品(甲酯)质谱总离子流图

1-己酸; 2-辛酸; 3-癸酸; 4-十一烷酸; 5-十二烷酸; 6-十三烷酸; 7-十四碳烯酸; 8-十五烷酸; 9-十五碳烯酸; 10-十七烷酸; 11-十七碳烯酸; 12-十八碳二烯酸; 13- γ -亚麻酸; 14- α -亚麻酸; 15-二十烷酸; 16-二十碳烯酸; 17-二十碳二烯酸; 18-二十一烷酸; 19-二十碳三烯酸; 20-山嵛酸; 21-二十碳五烯酸; 22-二十二碳烯酸; 23-二十二碳二烯酸; 24-二十三烷酸; 25-木蜡酸; 26-神经酸; IS-内标。

Fig. 1 Sample, blank, target compounds' the total ion flow profile of mass spectrometry in the standard (methyl-)

1-hexanoate; 2-octanoate; 3-decanoate; 4-undecanoate; 5-laurate; 6-tridecanoate; 7-myristate; 8-pentadecanoate; 9-pentadecenoate; 10-heptadecanoate; 11-heptadecenoate; 12-linoleate; 13-r-linolenate; 14- α -linolenate; 15-arachidate; 16-eicosenoate; 17-eicosadienoate; 18-heneicosanoate; 19-homogamma linoleate; 20-behenate; 21-eicosapentaenoate; 22-erucate; 23-docosadienoate; 24-tricosanoate; 25-lignocerate; 26-nervoate; IS-internal standard.

2.1.3 加样回收率 取混合血清样品 21 份, 按照“1.4.3”项下方法操作, 衍生化氮吹后, 分别用高、中、低 3 个浓度即 100, 25, 5 ng·mL⁻¹ 的对照溶液(每个浓度 6 份)复溶, 随行空白血清样品 3 份(100 μ L 正己烷复溶)。加样回收率方程式计算: 加样回收率(%)=[(回收率样品浓度-空白样品浓度)/加入样品浓度]×100%, 结果表明 FAMEs 的高、中、低 3 种浓度样品的回收率在 85.03%~115.18%, 且 RSD≤5.57%(<15%), 符合生物样品验证标准。结果见表 3。

2.1.4 残留效应 实验过程中, 通过高浓度样品(如定量上限)进样后, 连续进 2 针空白溶剂来考察残留效应。实验结果表示, 高浓度样品之后的空白试剂中, 各个化合物的峰浓度均不超过定量下限的 20%; 内标十九碳烯酸甲酯的峰浓度不超过正常内

标的 5%。结果表明每个目标化合物无残留影响。

2.1.5 基质效应 本实验研究对象为内源性物质, 空白血浆基质中本身就含有 FAMEs, 且生理盐水是血清中主要成分, 与血清最为接近^[8], 可代替空白基质进行方法学验证^[9], 因此本实验基质效应采用空白生理盐水考察。将生理盐水按“1.4.3”项下方法操作, 制备空白生理盐水样品 6 份, 100 μ L 正己烷复溶, 进样分析。结果显示, 高、低质控样品的内标归一化的基质因子的变异系数 CV≤13.56%(<15%), 表明在生理盐水基质条件下, 实验方法无明显基质效应。

2.1.6 稳定性 取混合血清 12 份, 按“1.4.3”项下方法操作, 衍生化氮吹后, 质控溶液复溶, 6 份直接进样分析; 3 份放入 4℃ 冰箱和另 3 份室温(25℃)放置 4 h 后进样, 考察不同条件下目标化合

表 3 目标化合物在高、中、低浓度对照溶液的加样回收率结果($n=6$)

Tab. 3 Standard recovery rate results of high, medium, low control samples of the target compounds($n=6$) %

编号	低浓度(5 ng·mL ⁻¹)		中浓度(25 ng·mL ⁻¹)		高浓度(100 ng·mL ⁻¹)	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
1	110.84~114.53	1.22	103.37~107.91	1.64	85.92~113.46	10.47
2	104.27~114.90	2.57	110.48~115.10	1.24	97.03~114.74	6.11
3	101.80~113.32	2.06	103.34~114.67	3.40	98.11~113.94	5.22
4	102.91~109.95	2.25	106.51~113.60	2.39	90.21~115.18	8.62
5	86.97~101.12	0.56	98.64~114.11	1.72	90.07~114.64	5.73
6	86.26~101.13	2.36	104.41~113.15	2.26	99.55~113.21	4.05
7	91.11~109.10	0.24	90.07~112.17	1.09	90.89~114.10	3.44
8	91.64~106.89	0.06	92.50~110.68	0.33	93.88~111.75	1.19
9	93.12~115.03	0.27	87.42~110.20	1.40	93.71~107.14	2.25
10	89.99~111.51	0.04	94.88~110.19	0.14	86.60~104.64	0.57
11	85.18~110.96	0.05	85.86~111.23	0.28	100.73~113.00	0.49
12	90.49~110.91	0.00	90.57~112.41	0.32	88.65~105.15	0.77
13	105.62~114.70	0.03	88.08~110.84	0.32	88.42~112.65	0.77
14	86.38~106.84	0.02	86.18~108.79	0.15	86.75~109.89	0.58
15	86.72~113.31	0.08	87.09~107.12	0.29	95.54~104.04	0.42
16	86.89~102.07	0.02	85.57~111.25	0.15	102.08~112.41	0.19
17	91.01~111.29	0.02	94.96~106.69	0.09	89.34~113.66	0.40
18	91.78~113.78	0.33	90.81~106.69	1.06	98.87~113.13	2.53
19	86.96~106.83	0.14	85.04~103.38	0.58	95.38~110.82	1.49
20	85.33~113.94	0.05	86.82~109.74	0.18	99.93~112.33	0.35
21	85.58~95.86	0.11	97.41~111.04	0.60	94.12~104.87	1.52
22	85.03~106.82	0.03	86.19~110.60	0.19	97.17~112.57	0.40
23	86.03~114.60	1.05	99.69~103.17	0.42	89.35~113.65	5.57
24	93.10~107.43	0.35	95.51~112.05	1.57	86.56~111.73	5.21
25	85.36~105.00	0.29	86.59~103.96	1.13	96.40~102.59	0.96
26	85.42~108.89	0.25	91.94~107.60	0.66	90.60~102.84	1.58

物的稳定性。实验结果显示,血清处理样品,无论 4℃ 还是 25℃ 条件下 0~4 h,结果精密度 $RSD \leq 13.87\%$ ($<15\%$),无显著区别,表明该方法下目标化合物稳定。

2.2 血清 FFAs 含量与高脂血症的相关性

2.2.1 小鼠血清中 FFAs 含量与高脂血症的关系

本实验小鼠血清中正常组总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量为 $(4.88 \pm 0.47) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,模型组 TC 含量为 $(10.26 \pm 0.85) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,给药组 TC 含量为 $(6.91 \pm 0.58) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;金黄地鼠血清中正常组 TC 含量为 $(3.73 \pm 0.62) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,模型组 TC 含量为 $(13.36 \pm 0.43) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,给药组 TC 含量为 $(10.22 \pm 0.74) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,证明动物实验高脂血症造模成功。血清 FFAs 含量差异见图 2A,若绿色倒三角在红色圆点右侧,说明辛伐他汀对高脂血症血清 FFAs

具有回调作用,反之则是降低作用;若蓝色圆点在红色圆点右侧,说明正常组血清 FFAs 含量比高脂血症模型组高,反之则低;且越偏离红色圆点,效果越明显。其中,化合物 2, 3, 24, 即辛酸、癸酸、11-二十碳烯酸与高脂血症血清中胆固醇含量负相关性相对较高,辛酸通过 TLR4/NF- κ B 信号通路改善血脂及动脉粥样硬化情况;癸酸通过上调解偶联蛋白 3 表达通路,激活过氧化物酶增殖激活受体(PPAR)- β 增加血脂氧化,从而改善血胆固醇浓度;而 11-二十碳烯酸是十八烷酸转化到神经酸的中间延伸体。因此,辛酸、癸酸、11-二十碳烯酸可作为高脂血症负相关生物标记物进行研究。2 类鼠种各个组别血清 FFAs 含量的热图见图 3。

结果表明,高脂血症小鼠血清中辛酸、十三烷酸、亚油酸等 19 个 FFAs 含量显著变化,且辛伐他汀对其中的 14 个 FFAs 具有显著的改善作用。其中,正常组与模型组中,具显著性差异的 FFAs 有 16 个,除十四碳烯酸外均与高脂血症模型组呈负相关,说明该 15 个 FFAs 可能通过调节各类信号通路增加血脂代谢,从而降低高脂血症病程发展进程。辛伐他汀给药组与模型组中,具显著性差异的 FFAs 除二十三烷酸外均与高脂血症模型组呈负相关的有 13 个,其中作为必须脂肪酸的 ω -3 类多不饱和脂肪酸即化合物 α -亚麻酸、二十碳三烯酸、二十碳五烯酸(EPA)同样具有抑制羟甲基二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶,能降低胆固醇、甘油三酯水平,抑制脂质聚集^[10],说明其可能与辛伐他汀降脂作用通路密切相关^[11-14]。

综上所述,小鼠血清中 26 个 FFAs 有 73% 的化合物含量与高脂血症密切相关,仅二十三烷酸含量在 2 组 t 检验中结果相反,可能与其作用于肝脏靶点,增加该自身转换所导致^[10]。在 2 次 t 检验中结果中,同时具有负相关显著性差异的为十七烷酸、 γ -亚麻酸、二十烷酸等 10 个 FFAs,进一步证实 FFAs 应作为表征高脂血症的新型生物标记物,对于高脂血症的治疗及预防具有研究意义,值得深入探究。

2.2.2 金黄地鼠血清中 FFAs 含量与高脂血症的关系 血清 FFAs 含量差异见图 2B,按“2.2.1”项下方法判断相关性。金黄地鼠血清 FFAs 与高脂血症血清中胆固醇含量相关性不高,说明该鼠种可能对总胆固醇中甘油三酯的代谢产物不敏感,适合除此之外的化合物的研究。

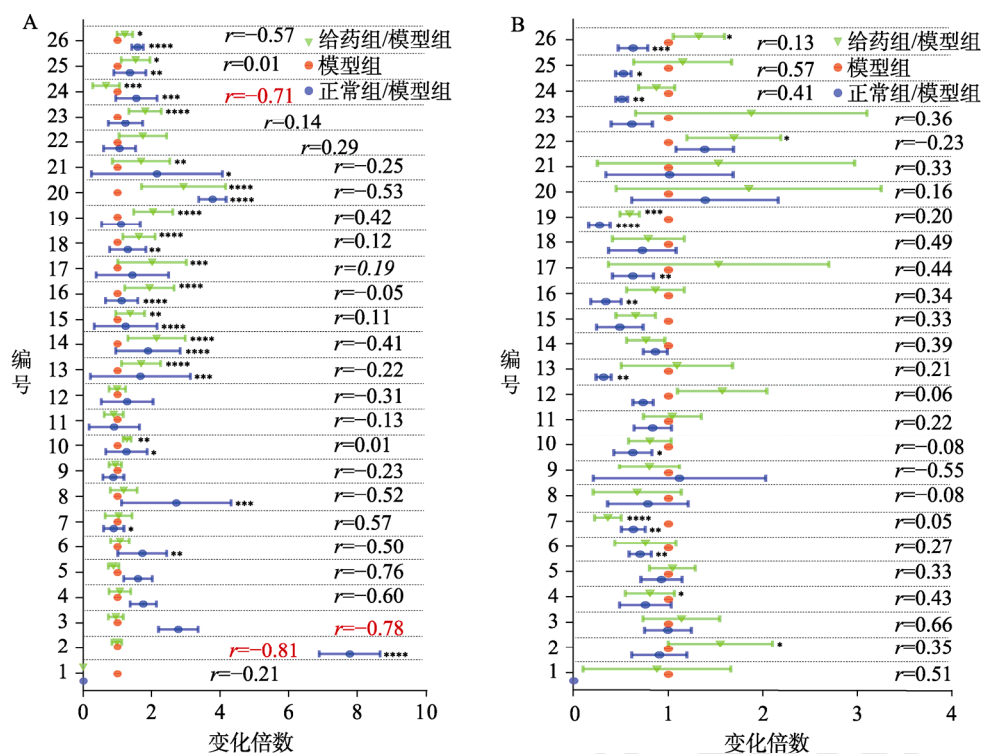


图2 2类鼠种正常组、模型组、给药组血清中26个FFAs的统计学显著性差异变化倍数

A-小鼠。B-金黄地鼠。 r -2种鼠类每个游离脂肪酸含量与总胆固醇含量的相关系数，标红的是相关性较高的FFAs。*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ ；***表示 $P<0.001$ ；****表示 $P<0.0001$ 。

Fig. 2 Statistically significant difference changes of 26 FFAs in the two types of mice serum between the normal group, the model group, and the administration group

A-mice; B-golden hamsters; r -the correlation coefficient in the content of each FFA and TC, the red was the higher than them. * meant $P<0.05$; ** meant $P<0.01$; *** meant $P<0.001$; **** meant $P<0.0001$.

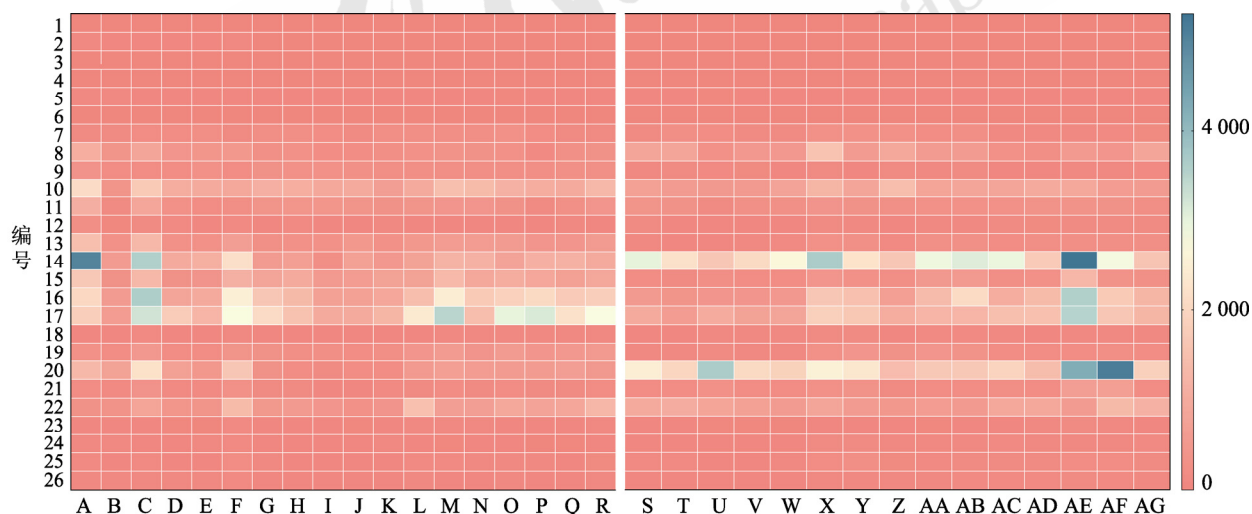


图3 2类鼠种血清中26个FFAs含量热图

A~R: 小鼠血清中FFAs含量，A~F是正常组；G~L是模型组；M~R是给药组。S~AG: 金黄地鼠血清中FFAs含量，S~W是正常组；X~AB是模型组；AC~AG是给药组。

Fig. 3 Heat map of 26 FFAs in the two types of mice serum

A~R: the content of FFAs in mice, A~F: normal group, G~L: model group, M~R: administration group. S~AG: the content of FFAs in golden hamsters, S~W: normal group, X~AB: model group, AC~AG: administration group.

图2B结果表明，金黄地鼠血清中有17个FFAs具有显著性差异，辛伐他汀仅对其中的5个FFAs具有显著的改善作用。其中，正常组与模型组含量

具显著性差异的FFAs有12个，呈下降趋势，均与高脂血症呈正相关；阳性组与模型组的含量显著性差异中，仅辛酸、十四碳烯酸、二十碳三烯酸、

二十二碳烯酸、二十四碳烯酸有显著性差异,除十四碳烯酸、二十碳三烯酸呈下降趋势外,其他均为回调趋势。

与上述小鼠血清 FFAs 相比, α -亚麻酸、山嵛酸也同样超过本实验定量上限。因此金黄地鼠血清中也有 70% 的 FFAs 与高脂血症发展进程密切相关,不同的是正常组金黄地鼠血清中 50% 的 FFAs 含量比模型组的高,且对降脂药物辛伐他汀的敏感程度较小鼠的弱,不排除因鼠种不同及体内调节基质不同而导致的差异性,也有可能是总脂肪在体质量中的占比差异。

3 讨论

本研究通过验证的 GC-MS 定量小鼠血清 FFAs 的分析方法,成功检测定量这些小鼠、金黄地鼠血清中 FFAs 含量,并比较正常组、模型组、给药组血清中 FFAs 显著性趋势。根据研究表明,癸酸、十五烷酸、二十碳五烯酸、二十二碳烯酸、神经酸能激活或上调控制代谢过程的 PPAR 的 3 种亚型 PPAR β ^[15-16]、PPAR α/β ^[17-18]、PPAR γ ^[19]、PPAR α ^[20],增加脂质氧化,降低胆固醇浓度,加速能量代谢,从而改善如代谢肥胖症状等慢性疾病^[21],本研究中,正常组和给药组的显著性数据符合该结论。另有研究表明长链 n -3 不饱和脂肪酸能显著减少体质量增加量,如化合物 α -亚麻酸、二十碳五烯酸能减少肝脏中脂质蓄积、白色脂肪组织,降低脂滴大小,来降低肥胖相关疾病的风险^[22-23],对应本实验正常组和给药组显著性结果。其他各个途径,如经 TLR4/NF- κ B 信号通路^[24],增加血清中脂质代谢^[25],增加脂肪酸氧化酶活性并降低脂质生成酶 mRNA 活性水平^[26-27],抑制胃肠脂酶使脂质吸收减少^[28],抑制胃饥饿素降低食欲从而改善体内脂质^[29],减少慢性肥胖趋势^[30-35],也符合本实验正常组和给药组的显著性结果。此外,化合物十四碳烯酸还能通过激活棕色脂肪组织形成米色脂肪增加能量代谢^[36]。还有和辛伐他汀机制一致的抑制 HMG-CoA 还原酶,减少体质量的增加,在预防和治疗高脂血症、血脂紊乱等脂质疾病中起重要作用^[37]。

综上所述,本实验结果表明在血清 FFAs 中,饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸的含量与高脂血症密切相关,且辛伐他汀对高脂小鼠血清脂脂肪酸的含量具有显著的改善作用。同时,比较了 2 类鼠种间 FFAs 与高脂血症及辛伐他汀的关系,不同物

种间差异大,说明鼠种间 FFAs 含量及辛伐他汀对 FFAs 调节作用差异大。后续可对人群样本作进一步研究,分析辛伐他汀治疗作用与高脂血症之间的联系。

REFERENCES

- [1] JAUREGIBETIA I, PORTUNE K, GAZTAMBIDE S, et al. Molecular differences based on erythrocyte fatty acid profile to personalize dietary strategies between adults and children with obesity[J]. *Metabolites*, 2021, 11(1): 43.
- [2] KAIN V, KAPADIA B, MISRA P, et al. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 13823.
- [3] SANDERS F W B, GRIFFIN J L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2016, 91(2): 452-468.
- [4] CORT A, OZBEN T, MELCHIORRE M, et al. Effects of bleomycin and antioxidants on the fatty acid profile of testicular cancer cell membranes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(2): 434-441.
- [5] SHI Q X, JIN S N, XIANG X L, et al. The metabolic change in serum lysoglycerophospholipids intervened by triterpenoid saponins from Kudung tea on hyperlipidemic mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(12): 7782-7792.
- [6] LIU L Y, LI Y, GUAN C M, et al. Free fatty acid metabolic profile and biomarkers of isolated post-challenge diabetes and type 2 diabetes mellitus based on GC-MS and multivariate statistical analysis[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(28): 2817-2825.
- [7] DAI L, GONÇALVES C M, LIN Z, et al. Exploring metabolic syndrome serum free fatty acid profiles based on GC-SIM-MS combined with random forests and canonical correlation analysis[J]. *Talanta*, 2015(135): 108-114.
- [8] HUANG H H, LIU D Y, HU Bei, et al. HPLC-MS/MS(ESI) simultaneous determination of dehydroepiandrosterone, testosterone and androsterone in human serum[J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(2): 210-216.
- [9] THAKARE R, CHHONKER Y S, GAUTAM N, et al. Quantitative analysis of endogenous compounds[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016(128): 426-437.
- [10] RISÉ P, GHEZZI S, MANZONI C, et al. The *in vitro* effects of cigarette smoke on fatty acid metabolism are partially counteracted by simvastatin[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009, 80(1): 71-75.
- [11] PATIL P, PATIL V, PARADKAR A. Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Acta Pharm*, 2007, 57(1): 111-122.
- [12] KOTLOVSKIY M Y, UDUT E V, KAIROV G T, et al. Effects of simvastatin on the metabolism of fatty acids in combined secondary prevention of coronary heart disease: Dosage and gender differences between the effects[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2020, 20(2): 93-107.

- [13] OFFMAN E, DAVIDSON M, NILSSON C. Assessment of pharmacokinetic interaction between *Omega*-3 carboxylic acids and the statins rosuvastatin and simvastatin: Results of 2 phase I studies in healthy volunteers[J]. *J Clin Lipidol*, 2017, 11(3): 739-748.
- [14] ALKHATATBEH M J, LINCZ L F, THORNE R F. Low simvastatin concentrations reduce oleic acid-induced steatosis in HepG 2 cells: An *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1487-1492.
- [15] ABE T, HIRASAKA K, KOHNO S, et al. Capric acid up-regulates UCP₃ expression without PDK4 induction in mouse C2C12 myotubes[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2016, 62(1): 32-39.
- [16] XU Q, ZHANG X S, ZHANG Y, et al. Effects of caprylic acid, capric acid or stearic acid on exogenous cholesterol absorption in intestine of ApoE^{-/-} mice[J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2018, 47(1): 119-127.
- [17] VENN-WATSON S, LUMPKIN R, DENNIS E A. Efficacy of dietary odd-chain saturated fatty acid pentadecanoic acid parallels broad associated health benefits in humans: Could it be essential?[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8161.
- [18] YOO W, GJUKA D, STEVENSON H L, et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189965.
- [19] TAKAHASHI A, DOHI H, EGASHIRA Y, et al. Erucic acid derived from rosemary regulates differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts/adipocytes via suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ transcriptional activity[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(6): 1358-1366.
- [20] KEPPELY L J W, WALKER S J, GADEMSEY A N, et al. Nervonic acid limits weight gain in a mouse model of diet-induced obesity[J]. *FASEB J*, 2020, 34(11): 15314-15326.
- [21] PETROMAN C, POPESCU G, SZAKAL R N, et al. Fatty acid profile of lipid fractions of mangalitza (*Sus scrofa domestica*) from Northern Romania: A GC-MS-PCA approach[J]. *Foods*, 2021, 10(2): 242.
- [22] SHOMONOV-WAGNER L, RAZ A, LEIKIN-FRENKEL A. Alpha linolenic acid in maternal diet halts the lipid disarray due to saturated fatty acids in the liver of mice offspring at weaning[J]. *Lipids Health Dis*, 2015(14): 14.
- [23] ZHANG L Y, DING L, SHI H H, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids suppressed lipid accumulation by specific inhibition of lipid droplet-associated protein FSP27 in mice[J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(5): 2244-2251.
- [24] ZHANG X S, XUE C Y, XU Q, et al. Caprylic acid suppresses inflammation via TLR4/NF- κ B signaling and improves atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2019(16): 40.
- [25] ZHANG F L, SONG M, CHEN L, et al. Dietary supplementation of lauric acid alleviates the irregular estrous cycle and the impaired metabolism and thermogenesis in female mice fed with high-fat diet (HFD)[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(45): 12631-12640.
- [26] QUAN L H, ZHANG C H, DONG M, et al. Myristoleic acid produced by enterococci reduces obesity through brown adipose tissue activation[J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1239-1247.
- [27] IDE T, ORIGUCHI I. Physiological effects of an oil rich in γ -linolenic acid on hepatic fatty acid oxidation and serum lipid levels in genetically hyperlipidemic mice[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2019, 64(2): 148-157.
- [28] WANG M, ZHANG X J, FENG K, et al. Dietary α -linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 26826.
- [29] MOREIRA D K T, SANTOS P S, GAMBERO A, et al. Evaluation of structured lipids with behenic acid in the prevention of obesity[J]. *Food Res Int*, 2017(95): 52-58.
- [30] LU X P, ZHAO X L, FENG J Y, et al. Postprandial inhibition of gastric ghrelin secretion by long-chain fatty acid through GPR120 in isolated gastric ghrelin cells and mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(3): G367-G376.
- [31] WANG Z Y, YUE L, DHANKHER O P, et al. Nano-enabled improvements of growth and nutritional quality in food plants driven by rhizosphere processes[J]. *Environ Int*, 2020(142): 105831.
- [32] GUO Q, WEI X J, HU H L, et al. The saturated fatty acid palmitate induces insulin resistance through Smad3-mediated down-regulation of FNDC5 in myotubes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(3): 619-626.
- [33] WOODFIELD H, HARWOOD J. Oilseed Crops: Linseed, Rapeseed, Soybean, and Sunflower [M]//Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 2th Ed. Amsterdam: Elsevier, 2017: 34-38.
- [34] MURPHY D J. Acyl lipids[M]//Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Amsterdam: Elsevier, 2017: 44-55.
- [35] WIESNER M, HANSCHEN F S, MAUL R, et al. Nutritional Quality of Plants for Food and Fodder[M]//Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 2th ed. Amsterdam: Elsevier, 2017: 285-291.
- [36] KINNEY A J. Oils[M]//Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Amsterdam: Elsevier, 2017: 87-92.
- [37] KIM S H, KIM M K, LEE H Y, et al. Prospective randomized comparison between Omega-3 fatty acid supplements plus simvastatin versus simvastatin alone in Korean patients with mixed dyslipidemia: Lipoprotein profiles and heart rate variability[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2011, 65(1): 110-116.

收稿日期: 2022-03-27

(本文责编: 李艳芳)