

## 虾青素对急性大强度运动大鼠心肌损伤影响的代谢组学研究

郭新明<sup>1</sup>,王佳<sup>1</sup>,曹秀慧<sup>2</sup>,高雅<sup>2</sup>,王焯璠<sup>2</sup>,吴丽君<sup>2\*</sup>

(1.太原师范学院 体育学院,山西 太原 030619;

2.山西大学 体育学院,山西 太原 030006)

**摘要:**本文采用液相色谱-质谱联用技术(Liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS),探究补充虾青素对急性大强度运动大鼠心肌代谢的影响。选取24只7周龄健康雄性SD(Sprague Dawley)大鼠,随机分为运动组(E组)和运动给药组(EM组)。EM组灌服油溶虾青素,剂量为25 mg/(kg·d),E组以同样剂量灌胃大豆油;4周运动适应性喂养后,两组大鼠进行一次急性大强度跑台运动,然后立刻处死所有大鼠采集血液及心肌组织,血液用于检测心肌损伤标志物cTnI,心肌样品经处理后进行LC-MS检测得到对应代谢图谱,采用数据处理软件XCMS、SIMCA-P、Excel、Origin等软件进行图像和数据处理与分析,找出差异代谢物并检索Met-PA及KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库,分析筛选出靶标代谢标志物及靶标代谢通路。结果显示,两组大鼠心肌差异代谢物有15种,参与了9条代谢通路,其中虾青素对急性大强度运动机体作用的潜在靶标通路有3条,分别是谷胱甘肽代谢、亚油酸代谢、半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路。参与靶标代谢通路的标志物有6种,分别是S-腺苷蛋氨酸、3-磷酸丝氨酸、1-硬脂酰基-2-油酰基卵磷脂(1-stearoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, SOPC)、谷胱甘肽、亚油酸、5-L-谷氨酰-L-丙氨酸,它们均与降低机体氧化应激,减少心肌损伤相关。表明虾青素主要通过调节半胱氨酸和蛋氨酸代谢、亚油酸代谢、谷胱甘肽代谢通路起到调节氧化应激,预防心肌损伤,保护心脏的作用。

**关键词:**虾青素;运动;损伤;多组学

中图分类号:G804.2

文献标志码:A

文章编号:0253-2395(2024)04-0874-11

## Metabolomic Study on the Effects of Astaxanthin on Myocardial Injury in Acute High-intensity Exercise Rats

GUO Xinming<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>, CAO Xiuhui<sup>2</sup>, GAO Ya<sup>2</sup>, WANG Yefan<sup>2</sup>, WU Lijun<sup>2\*</sup>

(1. School of Physical Education, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030619, China;

2. School of Physical Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** To investigate the effects of astaxanthin supplementation on myocardial metabolism in rats with acute high-intensity exercise by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Twenty four seven-week-old healthy male SD (Sprague Dawley) rats were randomly divided into two exercise groups (group E) and an exercise administration group (group EM). The EM group was given oil-soluble astaxanthin (25 mg/(kg·d)) and the E group was given the same dose soybean oil. The exercise methods of both groups were: one-time acute high-intensity treadmill exercise; intervention for 4 weeks; All rats were sacrificed immediately after the last acute high-intensity exercise, and the blood and myocardial tissue was collected. The cTnI in blood, a marker of myocardial injury was detected, after sample processing, the corresponding metabolic map was detected by LC-MS technology. For example, XCMS, SIMCA-P, Excel, Origin, and other software were used for image and data processing and analysis. The differential metabo-

收稿日期:2023-12-27;接受日期:2024-03-27

基金项目:山西省重点研发计划项目(201803D31030);教育部人文社会科学研究项目(20YJA890025)

作者简介:郭新明(1969-),男,山西太原人,教授,研究方向为运动与健康促进。E-mail:gxm7185@126.com

\* 通信作者:吴丽君(WU Lijun),E-mail:wlj666888@126.com

引文格式:郭新明,王佳,曹秀慧,等. 虾青素对急性大强度运动大鼠心肌损伤影响的代谢组学研究[J]. 山西大学学报(自然科学版),2024,47(4):874-884. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024061

lites were identified, and the target metabolic markers and metabolic pathways were screened by meT-PA and KEGG databases. The results showed that there were 15 kinds of differential metabolites in the myocardium of rats in the two groups, which were involved in 9 metabolic pathways. The glutathione metabolism, linoleic acid metabolism, cysteine, and methionine metabolism pathways were identified as three potential target pathways of astaxanthin. There were six markers involved in the target metabolic pathway: S-adenosyl methionine, serine 3-phosphate, SOPC, glutathione, and linoleic acid 5-L-glutamyl-L-alanine, they are related to the reduction of oxidative stress and myocardial injury. The results showed that astaxanthin can regulate oxidative stress, improve myocardial injury, and protect the heart by regulating the metabolism of cysteine and methionine, linoleic acid, and glutathione.

**Key words:** astaxanthin; exercise; injury; multiomics

## 0 引言

随着人民生活水平的提高,运动已成为大众保持健康的重要手段。适宜强度的运动可以提高机体的运动能力及心脏功能<sup>[1]</sup>,而急性大强度运动因其运动强度大,心肌需氧量迅速增加,极易发生缺血缺氧使自由基增多,从而造成运动性心肌损伤,反而威胁着人们的身体健康<sup>[2]</sup>。

虾青素(astaxanthin, ASTA)作为一种常见于海洋和水产动物的天然抗氧化剂,已被证实具有提高免疫力、预防心血管疾病、缓解运动疲劳以及提高运动能力等多种作用,被广泛应用于运动、医药、保健品、化妆品、食品添加剂等多个领域<sup>[3]</sup>。周海涛等研究发现补充虾青素可以有效阻止大强度运动后心肌的脂质过氧化,减轻运动后心肌缺血再灌注损伤,避免继发性伤害<sup>[2]</sup>。此外,一些实验证明虾青素还能抑制运动后小鼠肝脏及血液中氧化代谢产物丙二醛(MDA)的产生,增强超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,从而起到缓解疲劳,增强运动能力的作用<sup>[4]</sup>。

代谢组学作为系统生物学中重要的研究方法之一,主要采用血液、尿液或组织等生物样本研究生物体受刺激后其代谢产物种类、数量的变化,探究代谢规律<sup>[5-6]</sup>,为明确药物药效发挥机制及能量代谢治疗的应用提供支持。目前液相色谱-质谱联用(LC-MS)代谢技术因其高灵敏度、高分辨率等特点,成为代谢组学主要的研究技术之一<sup>[7-8]</sup>。

目前,关于天然虾青素对运动性心肌损伤改善机制的研究多通过相关蛋白水平检测<sup>[2]</sup>,未见采用代谢组学方法研究其对心肌代谢影响的研究。本实验采用LC-MS研究虾青素补充

对急性大强度运动大鼠心肌代谢的影响,明确虾青素发挥效应的作用途径,从代谢层面为虾青素作为营养补剂改善运动损伤提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

7周雄性SD大鼠24只,SPF级,体重(190±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证号SCXK(京)2016-0006),饲养于山西大学体育学院动物房,进行标准大鼠饲料喂养,动物饲养温度为26℃~28℃,湿度50%~60%,自然昼夜节律光照。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 动物分组

24只雄性SD大鼠适应性喂养4d后,随机分为运动组(E组,  $n=12$ )和运动给药组(EM组,  $n=12$ )。

#### 1.2.2 运动方案

本实验运动模式为一次性急性大强度跑台运动。跑台为大鼠专用跑台,长度为1m,坡度及运动速度可调,具有电刺激功能。(1)分组后,第1天大鼠进行适应性运动训练,运动强度为3m/min,5min/d,为期一周,确保大鼠熟悉实验环境。(2)第8天进行运动预适应,方案为初始速度3m/min,3min,休息1min后,速度增加3m/min,逐渐递增,直至力竭。大鼠力竭标准为其停留在跑台最后端,电击后腹部贴地跑步,3s内回到跑台最后端,重复5次<sup>[9]</sup>。(3)第22天再次进行递增速度运动,测试大鼠的运动能力<sup>[10]</sup>,得到大鼠75%VO<sub>2</sub>max对应的速度,结合Bedford的实验<sup>[11]</sup>,设定本实验大鼠急性大强度运动的速度为24m/min。(4)第29天E与EM组大鼠均做一次急性大强度运动。运动

方式为速度 24 m/min, 坡度  $-20^\circ$ , 每组 5 min, 间隔 1 min, 运动 8 组。

### 1.2.3 虾青素灌服方案

根据天然虾青素网站 (<http://www.asta.cn>) 专家的建议, 结合大鼠对虾青素的吸收状况, 本研究选用给药的剂量为 25 mg/(kg·d), 共干预 4 周。大鼠给药期间每隔两天对其进行一次体重称量, 并按大鼠体重变化调整药量给予<sup>[12]</sup>。EM 组每天灌胃一定量油溶虾青素, 油溶可促进大鼠机体对虾青素的吸收利用, E 组每天摄取同等量植物油<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 样本采集、处理及制备

在跑台运动前 24 h 断食, 运动后即刻 (10 min 内) 颈椎脱臼处死, 处死后即刻采集大鼠心肌, 收集的心脏组织于冰冷生理盐水中洗净血液, 并用滤纸将其吸干, 分份用铝箔纸包裹好于液氮中快速冷冻后装入密封袋中, 处理完毕后即刻放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中保存。

$-80^\circ\text{C}$  取出样本, 称量 80 mg 样本。各组各个样本均加 200  $\mu\text{L}$  水匀浆, 之后经 1 min 涡旋。加入 800  $\mu\text{L}$  乙腈和甲醇 1:1 混合液, 并充分搅拌。经两次低温超声 30 min/次。将样品溶液放在冰箱 1 h, 去除样品蛋白。在转速为 14 000 r/min, 温度为  $4^\circ\text{C}$  的离心机上离心 20 min。将上清液取出后通过冷冻, 对其干燥, 将所得样本于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。在样本中加 100  $\mu\text{L}$  乙腈水 1:1 的混合液, 充分混匀, 复溶样本。在  $4^\circ\text{C}$ , 转速为 14 000 r/min 离心样本 15 min。将所得的上清液取出进行质谱进样分析。

处死大鼠后即刻采集其股动脉血, 将采集的血液置于促凝管, 并以 3 500 r/min 的速度离心 10 min, 取上层血清保存备用, 待后续检测心肌损伤标志物 cTnI。

### 1.2.5 LC-MS 分析条件

#### 1.2.5.1 色谱条件

采用 Acquity UPLC BEH Amide (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱进行测定。样品放入自动进样器 (温度为  $4^\circ\text{C}$ ) 中进行分析, 按如下参数设置进行数据采集: 流动相 A (25 mmol/L 乙酸铵、水、25 mmol/L 氨水)-B (乙腈), 流动相梯度为 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 3~17 min, 65%~40% B; 8~9 min,

40% B; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, 95% B。体积流速 0.3 mL/min, 进样量 2  $\mu\text{L}$ , 柱温  $25^\circ\text{C}$ 。

#### 1.2.5.2 质谱条件

采用 ESI 电喷雾离子化方式; 正负离子两种检测模式, 对样本进行质谱分析, 获得样品的一级和二级质谱图。按如下参数设置进行数据采集: 离子源温度  $600^\circ\text{C}$ ; 离子浮动电压:  $\pm 5\ 500\ \text{V}$ ; TOF MS 扫描范围 60~1 000 Da; 产物离子扫描范围 25 Da~1 000 Da; TOF MS 单位光谱扫描收集时间为 0.2 s; 单位光谱产物离子扫描时间为 0.05 s。二级质谱在高敏感性模式下通过数据相关采集 (IDA) 得到, 数据采集重复 4 次, 扩大采集范围。

#### 1.2.6 数据处理

将采集的 LC-MS 数据导入 XCMS 软件进行完善、预处理 (提取图中峰面积、将峰进行对齐处理、校正代谢物的保留时间) 后, 得出数据。进而将 EXCEL 软件峰值归一化后的数据导入 SIMCA-P14.1 进行统计学上多维有监督分析, 即有监督偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA); SPSS 24.0 通过 *t* 检验以及变异倍数分析 (Fold Change Analysis, FC Analysis) 对代谢物进行统计学比较, 同时结合 OPLS-DA 所得标准筛选贡献最大的差异变量。通过 HMDB 数据库并结合二级碎片离子以及标准品对差异变量进行鉴定指认, 将鉴定所得差异代谢物数据通过 MetaboAnalyst 3.0 进行通路富集分析和利用 KEGG 在线数据库以及相关文献报道分析差异代谢物所涉及的相关代谢通路。

cTnI 实验数据使用 SPSS 25.0 统计分析, 用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 对两组间的差异进行分析。  $P < 0.05$  表示为显著性差异,  $P < 0.01$  表示为极显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 cTnI 检测结果

心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 作为临床常用心功能指标, 可用于评判心肌损伤程度。由表 1 可见, 与 E 组相比, EM 组 cTnI 含量明显下降

( $P < 0.01$ ), 表明虾青素补充可减少急性大强度运动大鼠体内 cTnI 含量, 缓解心肌损伤程度。

表1 大鼠血清心肌损伤指标含量( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Content of serum myocardial injury index in rats

组别	cTnI 含量/(ng/L)
E	2.26±0.08
EM	1.91±0.08**

\*表示相较于E,  $P < 0.05$ ; \*\*表示相较于E,  $P < 0.01$

## 2.2 LC-MS 测试结果

### 2.2.1 实验质量控制检测分析结果

将 QC (Quality Certificate) 样本的 UHPLC-Q-TOF MS (ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometry, 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪连用) 离子流图重叠对照 (图 1), 观察发现 QC 样本色谱图重叠良好, 仪器状态稳定, 实验数据可靠。其中横轴为保留时间, 纵轴为离子强度。

### 2.2.2 偏最小二乘判别分析(PLS-DA)结果

为了更直观了解各组代谢物之间的差异, 本实验采用 PLS-DA 对各组样本数据进行分析。PLS-DA 是运用偏最小二乘回归统计方法来识别实验数据, 对样品组别差异进行预测的分析方法。通过对两组大鼠心肌预处理后的数据进行了监督识别, 获得模型参数见 (表 2), 七

次循环验证, 正负离子的  $R^2Y$  和  $Q^2$  均  $> 0.5$  表明本实验 PLS-DA 模型能准确地描述数据。PLS-DA 得分显示 (图 2), EM 组与 E 组的正负离子的点分散趋势明显, 说明各组间代谢具有差异性, 模型建立稳定可靠。

表2 PLS-DA 分析模型参数表

Table 2 Parameter of PLS-DA analysis model

样品 分组	负离子模式			正离子模式				
	A	$R^2X$ (cum)	$R^2Y$ (cum)	$Q^2$ (cum)	A	$R^2X$ (cum)	$R^2Y$ (cum)	$Q^2$ (cum)
EM/E	3	0.445	0.993	0.718	2	0.292	0.996	0.885

A 为主成分数目;  $R^2$  是模型对变量 X 或 Y 的解释率;  $Q^2$  为模型预测能力

### 2.2.3 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果

为验证模型可靠性, 对 OPLS-DA 模型进行 200 次随机排列实验 (图 3), 结果表明,  $R^2$  值 (绿色) 在同一横坐标上均大于  $Q^2$  值 (蓝色), 且  $R^2$  与  $Q^2$  最右侧的点均大于其他点,  $Q^2$  最左侧值小于 0, 表明本研究模型验证通过, 各对照组代谢物存在差异, 使 PLS-DA、OPLS-DA 结果分析有意义。OPLS-DA 统计方法对 PLS-DA 实验数据完善与修正, 增强了组别间差异的显著性。表 3 中  $R^2Y$  与  $Q^2$  均  $> 0.5$ , 证明 OPLS-DA 模型稳定可靠。OPLS-DA 得分显示 (图 4), EM 组与 E 组的正负离子的点分散趋势明显, 说明各

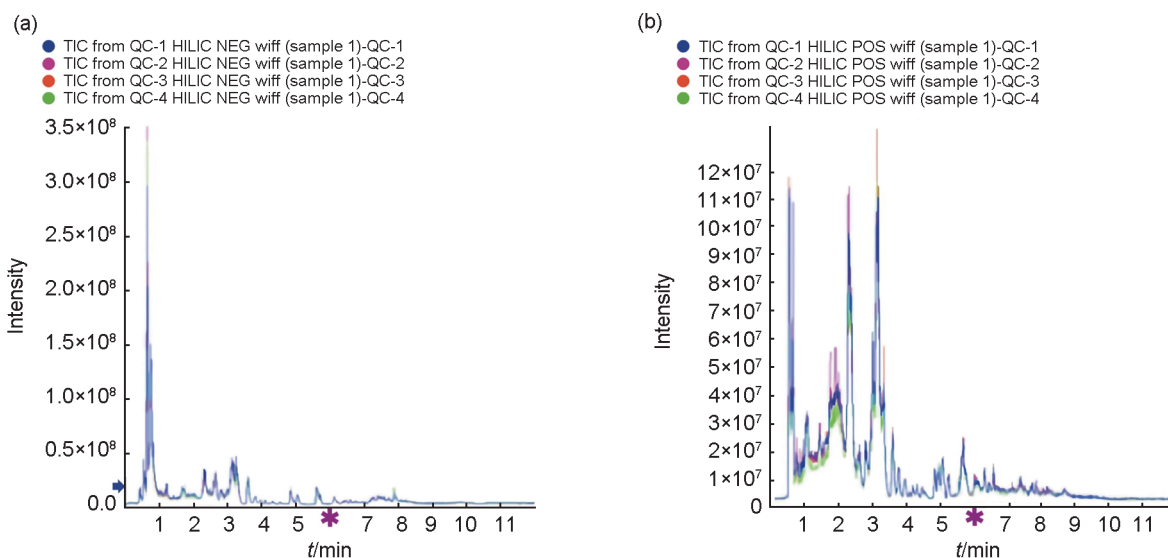


图1 QC 样本负、正离子模式 TIC 重叠图谱

(a) EM/E 组负离子; (b) EM/E 组正离子

Fig. 1 Overlapping patterns of negative and positive ion modes TIC in QC samples

(a) Negative ions in group EM/E; (b) positive ions in group EM/E

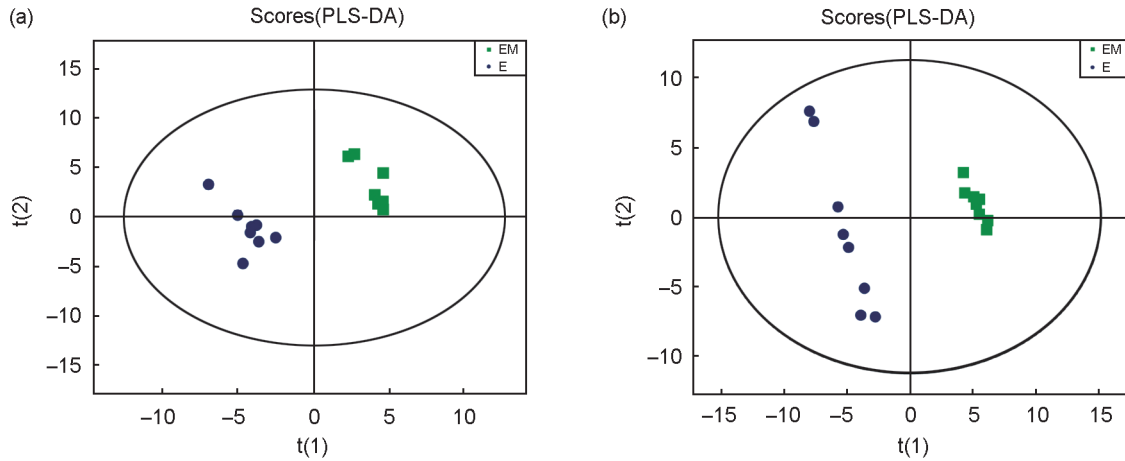


图2 心肌样本正、负离子PLS-DA得分图

(a) EM/E组负离子; (b) EM/E组正离子(蓝色表示EM组,绿色表示E组)

Fig. 2 LC/MS based PLS-DA of rat myocardial samples from group EM and group E

(a) Negative ions in group E/EM; (b) positive ions in group E/EM

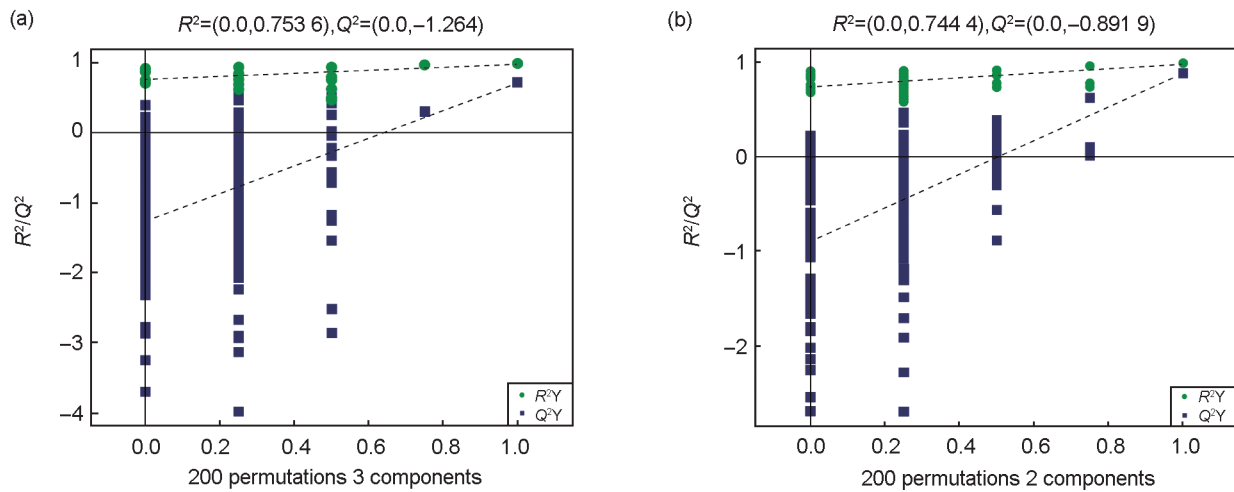


图3 心肌样本OPLS-DA模型置换检验图

(a) EM/E组负离子; (b) EM/E组正离子横坐标表示置换检验的置换保留度,纵坐标表示R<sup>2</sup>或Q<sup>2</sup>的取值

Fig. 3 LC/MS based OPLS-DA permutation test diagram of rat myocardial samples from group EM and group E

(a) Negative ions in group EM/E; (b) positive ions in group EM/E. Abscissa: permutation retention for permutation tests; Ordinate: the value of R<sup>2</sup> or Q<sup>2</sup>

组间代谢具有差异性,模型建立稳定可靠。

### 2.2.4 单变量统计分析

本研究使用了t检验、FC分析,两种方法共同使用制成火山图(Volcano Plot),直观明确地展现了两组大鼠心肌显著变化的代谢物。图5中红色点为两组间的差异代谢物,在检验概率P<0.05基础上,变异倍数分析FC>1.5或FC<0.67,即坐标中左上角与右上角的物质为差异代谢物。

### 2.2.5 显著性差异代谢物对比结果

以OPLS-DA中分析获得变量权重值

(VIP)>1.0,检验概率P<0.05,变异倍数分析FC>1.5或FC<0.67(FC>1.5为差异代谢物显著升高,FC<0.67为差异代谢物显著降低)进一步对两组实验数据中的差异物进行筛选分析,筛选出EM/E组正负离子共有15种差异代谢物,见表4。

### 2.2.6 差异代谢物聚类分析

将EM/E组心肌差异代谢物进行聚类分析,结果如图6所示。横轴为对比两组各个样本的聚类情况,纵轴为两组间代谢物聚类情况。红色表示代谢物显著升高,蓝色表示代谢物显著

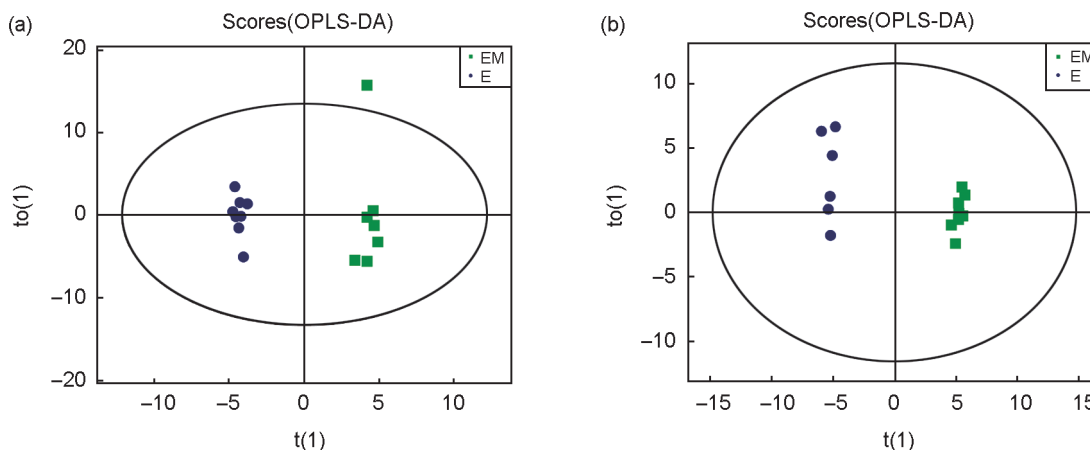


图4 心肌样本正负离子OPLS-DA图  
(a) EM/E负离子; (b) EM/E组正离子

Fig. 4 OPLS-DA diagram of positive and negative ions in myocardial samples  
(a) EM/E negative ions; (b) Group EM/E positive ions

表3 OPLS-DA 分析模型参数

Table 3 Parameter of OPLS-DA analysis model

样品 分组	负离子模式				正离子模式			
	A	R <sup>2</sup> X (cum)	R <sup>2</sup> Y (cum)	Q <sup>2</sup> (cum)	A	R <sup>2</sup> X (cum)	R <sup>2</sup> Y (cum)	Q <sup>2</sup> (cum)
EM/E	1+2	0.445	0.993	0.760	1+1	0.292	0.996	0.832

A表示主成分, R<sup>2</sup>X表示模型对X变量的解释率; R<sup>2</sup>Y表示模型对Y变量的解释率; Q<sup>2</sup>表示模型预测能力。

下降。同一组别颜色变化较为集中, 不同组别颜色具有鲜明对比, 由图可见, EM/E心肌代谢差异物组内差异较小, 组间差异较明显。

2.2.7 差异代谢物通路分析

为明确补充虾青素干预急性大强度运动后

潜在差异代谢物所涉及相关的代谢通路, 将虾青素干预后的15种显著变化的差异代谢物进行Met-PA通路富集分析。导入Met-PA数据库进行整合后, 筛选出经虾青素干预后明显能改变的代谢通路分别为亚油酸代谢、精氨酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、烟酸和烟酰胺代谢等25条代谢通路。以Raw  $P < 0.05$ ,  $Impact > 0.05$ 为靶向通路筛选标准, 发现补充虾青素对运动机体影响最大的靶标通路有3条, 见图7, 分别为半胱氨酸与蛋氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、亚油酸代谢; 靶标代谢物有6种, 见表5, 分别为S-腺苷蛋氨酸、SOPC、3-磷酸丝氨酸、谷

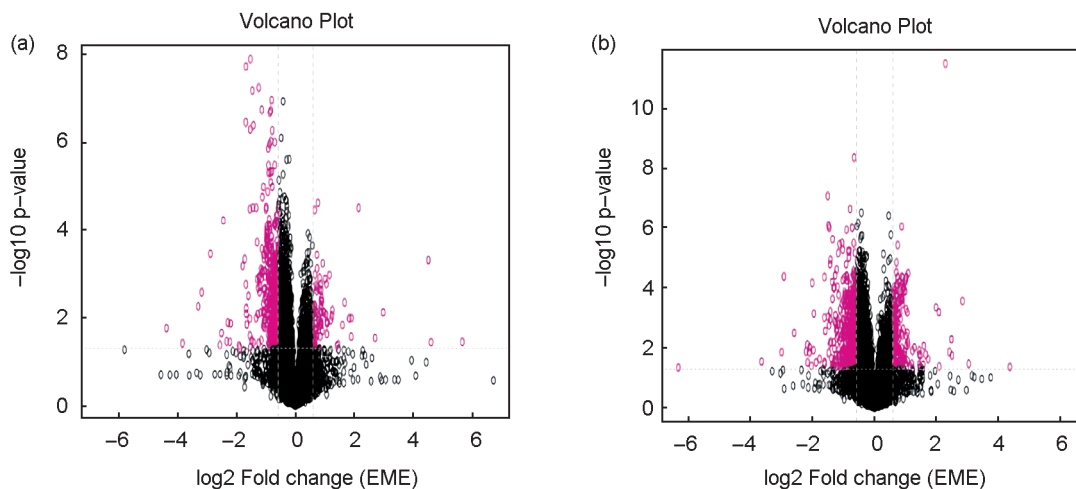


图5 心肌样本负、正离子模式火山图  
(a) EM/E负离子; (b) EM/E组正离子

Fig. 5 Volcano figure of positive and negative ion patterns of myocardial samples  
(a) EM/E negative ions; (b) Group EM/E positive ions

表4 EM/E组正负离子模式下代谢差异物

Table 4 Metabolic differentials in EM/E group in positive and negative ion mode

模式	序号	质荷比	保留时间/s	差异代谢物	变化趋势
ESI+	1	300.288	35.794	棕榈酰乙醇酰胺 1-硬脂酰基-2-油	↓**
ESI+	2	810.599	50.791	酰基卵磷脂 (SOPC)	↓**
ESI+	3	338.340	33.064	芥酸酰胺	↓**
ESI+	4	252.107	141.212	脱氧腺苷 1-硬脂酰基-2-花	↓**
ESI+	5	627.529	190.834	生四烯酰基-sn- 甘油	↓**
ESI+	6	308.089	399.393	谷胱甘肽	↑**
ESI+	7	147.111	579.695	D-哌柯林酸	↓**
ESI+	8	132.075	407.273	肌酸	↓**
ESI+	9	400.339	169.317	L-棕榈酰肉碱	↓*
ESI+	10	399.142	489.232	S-腺苷蛋氨酸	↑*
ESI-	11	185.011	58.068	3-磷酸丝氨酸	↓**
ESI-	12	339.199	26.956	醋酸炔诺酮	↓*
ESI-	13	199.069	339.909	5-L-谷氨酰-L- 丙氨酸	↓*
ESI-	14	303.231	102.156	花生四烯酸(不含 过氧化物)	↓*
ESI-	15	279.231	157.648	亚油酸	↓*

\*表示两组间相比 $P<0.05$ ; \*\*表示两组间相比 $P<0.01$ ; ↑表示差异物变化为上升趋势; ↓表示差异物变化为下降趋势。

胱甘肽、亚油酸、5-L-谷氨酰-L-丙氨酸。

### 3 讨论与分析

急性大强度运动作为一种短时间高强度运动,会使机体新陈代谢加快,氧自由基增多,机体内环境稳态破坏、代谢紊乱。研究表明,虾青素作为强抗氧化物,可通过调节机体氧化平衡,维持内环境稳定,减轻运动后缺血再灌注损伤,有效阻止大强度运动后心肌的脂质过氧化及心肌损伤,但其作用机制尚不十分明确。因此,本研究采用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS),通过对虾青素补充前后运动心肌代谢差异物的寻找,从代谢层面探究虾青素补充对急性大强度运动心肌损伤的影响。

#### 3.1 亚油酸代谢通路分析

亚油酸(LA)、1-硬脂酰基-2-油酰基卵磷脂(SOPC)共同参与亚油酸代谢。LA是公认的人和动物必需的一种脂肪酸,具有降血脂、

降血压,治疗动脉硬化等作用。LA是游离脂肪酸(FFA)中的一种多不饱和脂肪酸,又被称为亚油酸,在人体中含量丰富,由于其结构中包  
含不饱和双键,所以在脂肪氧合酶(LOX)、细胞色素和自由基等作用下极易发生氧化,造成细胞内环境紊乱<sup>[14-15]</sup>。LA形成的氧化产物之一为羟基亚油酸(HODEs)<sup>[16]</sup>。高浓度的HODEs可造成巨噬细胞凋亡和促炎因子生成,进而导致动脉粥样硬化及心肌梗死等疾病发生<sup>[17]</sup>。Stadiotti等研究发现,当机体剧烈运动时,人体摄氧量不能满足自身需求,就会改变机体代谢结构,脂肪酸代谢明显加强,出现LA及其氧化产物的过量堆积,继而出现心肌细胞损伤,造成心肌功能的异常<sup>[18]</sup>。Bandeira等研究发现,LA作为FFA中的重要组成成分,当血液中存在高浓度的FFA时,会抑制氧化型谷胱甘肽(GSSG)向还原型谷胱甘肽(GSH)转化,减慢清除 $H_2O_2$ 的速率,抑制机体氧化还原反应<sup>[19]</sup>。说明LA的过度累积会干扰GSH介导的氧化还原反应。本研究中,EM组与E组相比,心肌的LA( $P<0.05$ )、SOPC( $P<0.01$ )含量显著下降,cTnI含量显著下降( $P<0.01$ ),表明虾青素补充可减少游离脂肪酸堆积,改善机体氧化应激,增强急性大强度运动大鼠心肌亚油酸代谢,从而减少心肌损伤。

#### 3.2 谷胱甘肽代谢通路分析

谷胱甘肽(GSH)、5-L-谷氨酰-L-丙氨酸共同参与谷胱甘肽代谢通路。谷胱甘肽(Glutathione)是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的三肽,可以帮助机体维持正常免疫功能,并具有抗氧化、保护肾脏、解毒、延缓衰老及美白等作用,是人体重要的抗氧化剂<sup>[20-21]</sup>。研究发现,GSH在机体氧化还原过程中发挥重要作用,当细胞内自由基增多时,大量GSH会转化为GSSG,机体对GSH的利用率增加,从而维持氧化还原状态,保持机体内环境稳定<sup>[22]</sup>;此外,GSH还可以在谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的催化下,将过氧化氢和脂质过氧化物转化为低毒性物质,从而保护生物膜及其他分子免受自由基伤害<sup>[23]</sup>。然而当运动强度过大时,机体内GSH含量不足以清除大量自由基,最终造成机体出现运动损伤。Polotow等研究发现,大鼠

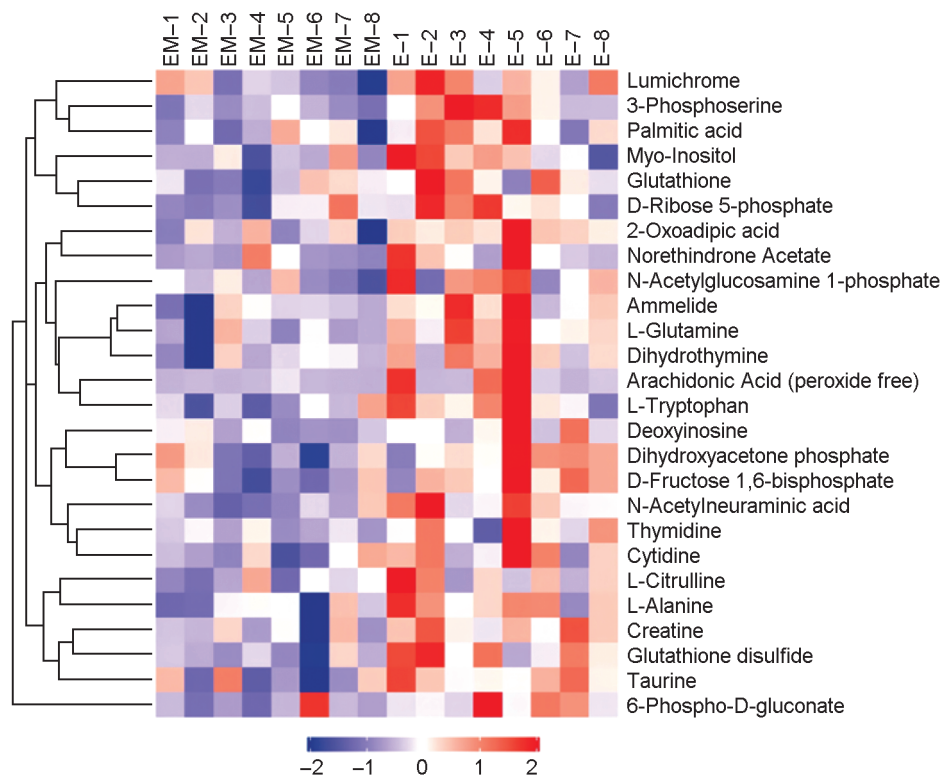
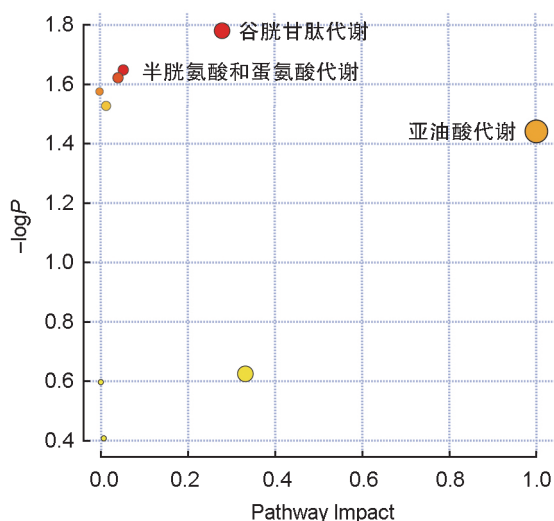


图6 EM/E组心肌样本显著性差异代谢物层次聚类

Fig. 6 Significant difference of myocardial samples in EM/E group Metabolite hierarchy clustering



注: 横坐标 Pathway impact 表征由拓扑分析计算所得代谢通路的重要性值, 纵坐标  $-\log P$  表示代谢通路富集分析的显著性水平。代谢通路的 Pathway impact 与  $-\log P$  值越大, 组间代谢差异的相关性越高, 图中的圆圈越大

图7 EM/E组心肌样本心肌靶标代谢物通路

Fig. 7 Myocardial targeted metabolite pathways in EM/E myocardial samples

剧烈运动中补充虾青素可显著增加机体 GSH 含量, 增强抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性, 抑制脂质过氧化, 具有极强的抗氧化功效<sup>[24]</sup>。吴丽

表5 靶标代谢物 KEGG ID 及参与的代谢通路

Table 5 Target metabolite KEGG ID and the metabolic pathways involved

代谢物	KEGG ID	参与的代谢通路
亚油酸	C01595	亚油酸代谢
SOPC	C00157	亚油酸代谢
谷胱甘肽	C00051	谷胱甘肽代谢
3-磷酸丝氨酸	C01005	谷胱甘肽代谢
S-腺苷蛋氨酸	C00019	半胱氨酸与蛋氨酸代谢
5-L-谷氨酰-L-丙氨酸	C03740	半胱氨酸与蛋氨酸代谢

君等研究表明, 外源性补充虾青素一方面可以促进机体内 GSH 的合成, 提高它参与氧化还原反应的能力和效率; 另一方面, 虾青素可直接参与体内自由基的清除, 从而减少机体 GSH 的消耗<sup>[25]</sup>。本研究中, EM 组与 E 组相比, 心肌谷胱甘肽 ( $P < 0.01$ ) 含量显著上升, 也表明虾青素补充促进了 GSH 在机体内的累积, 对加速自由基的清除, 保护心肌免受氧化损伤具有积极作用。此外, 本研究还观察到 5-L-谷氨酰-L-丙氨酸 ( $P < 0.05$ ) 水平显著下降。5-L-谷氨酰-L-丙氨酸又称  $\gamma$ -L-谷氨酰-L-丙氨酸, 在植物中多见于大蒜, 是一种由谷氨酸和丙氨酸组成的

二肽,可通过 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶分解合成GSH,参与机体抗氧化<sup>[26]</sup>。Zhai等研究发现,5-L-谷氨酰-L-丙氨酸含量与机体氧化应激水平密切相关,抗氧化剂低聚原花青素可加速血清中5-L-谷氨酰-L-丙氨酸的分解,促进GSH的合成,从而起到抵抗氧化应激,缓解机体炎症,保护机体功能的作用<sup>[27]</sup>。曾繁强研究发现,用毛鸡酒干预血虚大鼠可明显降低大鼠血浆中MDA的含量,提高血浆中总抗氧化能力(T-AOC)值,从而清除多余自由基,发挥抗氧化作用;而在其代谢组学分析中发现,毛鸡酒显著降低血虚大鼠血浆中5-L-谷氨酰-L-丙氨酸的相对含量,说明毛鸡酒同样可加速5-L-谷氨酰-L-丙氨酸向GSH的转化,通过调节谷胱甘肽的代谢,减轻机体的氧化损伤<sup>[28]</sup>。本研究也证实了这一结果,EM组与E组相比,5-L-谷氨酰-L-丙氨酸( $P<0.05$ )含量显著下降,cTnI含量显著下降( $P<0.01$ ),说明虾青素补充可显著促进大强度运动大鼠心肌内5-L-谷氨酰-L-丙氨酸向GSH的转化合成,从而改善运动机体氧化应激反应,对心肌起到保护作用。

### 3.3 半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路分析

3-磷酸丝氨酸(Ser-P)、S-腺苷蛋氨酸(SAM)共同参与半胱氨酸与蛋氨酸代谢。S-腺苷蛋氨酸,又称S-腺苷甲硫氨酸(SAM),是由甲硫氨酸和三磷酸腺苷(ATP)在S-腺苷蛋氨酸转移酶作用下合成的化合物,作为甲基供体和半胱氨酸、谷胱甘肽、牛磺酸等重要物质的前体,具有生成抗氧化物清除自由基,改善细胞氧化应激状态的能力<sup>[29-30]</sup>。但是,SAM在甲基转移酶作用下可生成S-腺苷高半胱氨酸(SAH),研究发现,SAH极易氧化生成活性氧,造成内环境失衡,因此SAH被认为是糖尿病心肌病及微血管病变的危险因素<sup>[31]</sup>。同时,活性氧在体内大量堆积时,可攻击体内不饱和脂肪酸,使细胞内核转录因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路活化,从而诱导肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的活化,引起心肌损伤<sup>[29]</sup>。SAH的大量积累及线粒体SAM的大量消耗,被认为是细胞对TNF敏感性增强的内在机制,SAM/SAH的比例与细胞对肿瘤坏死因子TNF敏感性成负相关<sup>[32-33]</sup>。有研究表明SAM可降低血清TNF-

$\alpha$ 和TGF- $\beta$ 含量<sup>[34]</sup>,外源性补充SAM可以降低血清中TNF- $\alpha$ 的含量,改善体内NF- $\kappa$ B的表达水平,调节细胞脂质过氧化,从而保护心肌免受活性氧(ROS)攻击发生损伤<sup>[33]</sup>。陈刚等研究发现,虾青素补充后,糖尿病心肌病大鼠体内SAM含量增多,SAM/SAH的比值增加,降低了细胞对肿瘤坏死因子TNF的敏感性;同时也清除了SAH氧化生成的活性氧,从而对心血管系统起到积极的保护作用<sup>[29]</sup>。本研究中,EM组与E组相比,SAM( $P<0.05$ )含量显著升高,也表明虾青素补充增加了SAM的合成,有助于改善急性大强度运动造成的氧化应激状态,从而对大鼠心肌起到良好保护作用。3-磷酸丝氨酸(3-Phosphoserine, Ser-P),亦称磷酸化丝氨酸,由糖酵解中间产物3-磷酸甘油酸在3-磷酸甘油酸脱氢酶作用下,氧化成磷酸羟基丙酮酸并接受谷氨酸中的氨基后形成,当其去磷酸化后会最终合成丝氨酸<sup>[35]</sup>。研究发现,在乳腺癌、肾癌、淋巴瘤等多种癌症中丝氨酸生物合成途径活性上调,被认为是癌症的明显特征。此外,丝氨酸通过叶酸介导的一碳通路可以转化为甘氨酸和单碳单位,从而协助核苷酸、SAM和GSH等抗氧化物质在体内的合成。本研究中,EM组与E组相比,Ser-P( $P<0.01$ )含量显著下降,cTnI含量显著下降( $P<0.01$ ),表明虾青素可减弱Ser-P的形成,即抑制了丝氨酸生物合成途径的活性,又提高Ser-P在机体的利用率,加速核苷酸、SAM和GSH在体内的合成,从而减轻机体氧化应激,保护心脏。

## 4 结论

本研究主要采用LC-MS技术探究补充虾青素对急性大强度运动大鼠心肌代谢的影响。研究结果表明,虾青素主要通过调节半胱氨酸和蛋氨酸代谢、亚油酸代谢、谷胱甘肽代谢通路起到调节氧化应激,预防心肌损伤,保护心脏的作用。

### 参考文献:

- [1] 饶志坚,常芸,王世强,等.长期大强度耐力运动对心脏的不利影响[J].体育科学,2016,36(6):46-54. DOI:10.16469/j.css.201606005.  
RAO Z J, CHANG Y, WANG S Q, *et al.* Adverse Effects

- of Long-term Intensity Endurance Exercise on the Heart [J]. *China Sport Sci*, 2016, **36**(6): 46–54. DOI: 10.16469/j.css.201606005.
- [2] 周海涛, 曹建民, 郭娟, 等. 虾青素对大鼠运动性心肌损伤的保护作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, **28**(7): 1150–1155. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.028.  
ZHOU H T, CAO J M, GUO X, *et al*. Protective Effects of Astaxanthin on Exercise-induced Myocardial Injury in Rat[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2016, **28**(7): 1150–1155. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.028.
- [3] 苏铁柱. 虾青素的生理功能及其在运动中的应用[J]. *商洛学院学报*, 2014, **28**(2): 87–91. DOI: 10.13440/j.slxy.1674-0033.2014.02.022.  
SU T Z. Physiological Function of Astaxanthin and Its Application in Sports[J]. *J Shangluo Univ*, 2014, **28**(2): 87–91. DOI: 10.13440/j.slxy.1674-0033.2014.02.022.
- [4] 王茵, 刘淑集, 苏永昌, 等. 天然虾青素的抗疲劳及抗氧化作用研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2015, **37**(9): 42–48. DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.09.007.  
WANG Y, LIU S J, SU Y C, *et al*. Study on the Anti-fatigue and Anti-oxidant Effects of Natural Astaxanthin[J]. *J Southwest Univ Nat Sci Ed*, 2015, **37**(9): 42–48. DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.09.007.
- [5] MEDINA S, DOMINGUEZ-PERLES R, GIL J I, *et al*. Metabolomics and the Diagnosis of Human Diseases—a Guide to the Markers and Pathophysiological Pathways Affected[J]. *Curr Med Chem*, 2014, **21**(7): 823–848. DOI: 10.2174/0929867320666131119124056.
- [6] LU A P, BIAN Z X, CHEN K J. Bridging the Traditional Chinese Medicine Pattern Classification and Biomedical Disease Diagnosis with Systems Biology[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, **18**(12): 883–890. DOI: 10.1007/s11655-012-1290-6.
- [7] THEODORIDIS G A, GIKA H G, WANT E J, *et al*. Liquid Chromatography-mass Spectrometry Based Global Metabolite Profiling: A Review[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **711**: 7–16. DOI: 10.1016/j.aca.2011.09.042.
- [8] FORCISI S, MORITZ F, KANAWATI B, *et al*. Liquid Chromatography-mass Spectrometry in Metabolomics Research: Mass Analyzers in Ultra High Pressure Liquid Chromatography Coupling[J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1292**: 51–65. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.017.
- [9] CHAVES F M, BAPTISTA I L, SIMABUCO F M, *et al*. High-intensity-exercise-induced Intestinal Damage is Protected by Fermented Milk Supplemented with Whey Protein, Probiotic and Pomegranate (*Punica granatum L.*)[J]. *Br J Nutr*, 2018, **119**(8): 896–909. DOI: 10.1017/S0007114518000594.
- [10] BEDFORD T G, TIPTON C M, WILSON N C, *et al*. Maximum Oxygen Consumption of Rats and Its Changes with Various Experimental Procedures[J]. *J Appl Physiol*, 1979, **47**(6): 1278–1283. DOI: 10.1152/jappl.1979.47.6.1278.
- [11] FERREIRA J C B, ROLIM N P L, BARTHOLOMEU J B, *et al*. Maximal Lactate Steady State in Running Mice: Effect of Exercise Training[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, **34**(8): 760–765. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.
- [12] 沈宁. 补充天然虾青素对递增负荷训练大鼠骨骼肌自由基代谢的影响[J]. *成都体育学院学报*, 2014, **40**(2): 75–79. DOI: 10.15942/j.jcsu.2014.02.014.  
SHEN N. Influence of Natural Astaxanthin Supplementation on the Increasing Load Training Filtration Skeletal Muscle Metabolism of Free Radicals[J]. *J Chengdu Sport Univ*, 2014, **40**(2): 75–79. DOI: 10.15942/j.jcsu.2014.02.014.
- [13] 郑勇. 运动强度对大鼠心肌线粒体机能的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(1): 227–229. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.0171.  
ZHENG Y. Effect of Exercise Intensity on Myocardial Mitochondrial Function in Rats[J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017(1): 227–229. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.0171.
- [14] KIM H, JANG Y S, HOU C T. Effect of Metal Ions on the Production of Isomeric 9, 10, 13 (9, 12, 13)-trihydroxy-11E (10E)-octadecenoic Acid from Linoleic Acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **30**(6): 752–757. DOI: 10.1016/s0141-0229(02)00053-4.
- [15] GARDNER H W. Oxygen Radical Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acids[J]. *Free Radic Biol Med*, 1989, **7**(1): 65–86. DOI: 10.1016/0891-5849(89)90102-0.
- [16] NIKI E. Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, **47**(5): 469–484. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032.
- [17] CHOQUE B, CATHELINE D, RIOUX V, *et al*. Linoleic Acid: Between Doubts and Certainties[J]. *Biochimie*, 2014, **96**: 14–21. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.012.
- [18] STADIOTTI I, LIPPI M, MAIONE A S, *et al*. Cardiac Biomarkers and Autoantibodies in Endurance Athletes: Potential Similarities with Arrhythmogenic Cardiomyopathy Pathogenic Mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(12): 6500. DOI: 10.3390/ijms22126500.
- [19] DE M BANDEIRA S, DA FONSECA L J S, DA S GUEDES G, *et al*. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complica-

- tions in Diabetes Mellitus[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(2): 3265–3284. DOI: 10.3390/ijms14023265.
- [20] 蔺艳, 何涛, 毛晓燕, 等. 还原型谷胱甘肽对肾急性缺血再灌注性损伤的作用[J]. *实用医学杂志*, 2016, **32**(8): 1233–1236. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.08.010.
- LIN Y, HE T, MAO X Y, *et al.* Protective Effect of Reduced Glutathione on Kidney Against Acute Ischemia-reperfusion Injury[J]. *J Pract Med*, 2016, **32**(8): 1233–1236. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.08.010.
- [21] 赵思佳, 聂瑾, 贾虹. 谷胱甘肽美白淡斑面膜改善黄褐斑的效果观察[J]. *中华医学美容美容杂志*, 2020, **26**(5): 413–416. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0290.2020.05.016.
- ZHAO S J, NIE J, JIA H. Clinical Effects of Reduced Glutathione Whitening Facial Mask on Melisma[J]. *Chin J Med Aesthet Cosmetol*, 2020, **26**(5): 413–416. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0290.2020.05.016.
- [22] 胡娟娟. 功能性食品对体育运动员体能的影响[J]. *食品研究与开发*, 2021, **42**(13): 225–226.
- HU J J. Effect of Functional Food on Physical Fitness of Athletes[J]. *Food Res Dev*, 2021, **42**(13): 225–226.
- [23] 张琳, 武胜奇, 熊正英. S-腺苷甲硫氨酸与运动[J]. *体育学刊*, 2004, **11**(3): 45–47. DOI: 10.16237/j.cnki.cn44-1404/g8.2004.03.012.
- ZHANG L, WU S Q, XIONG Z Y. S-Adenosyl-L-methionine and Sports(a Review)[J]. *J Phys Educ*, 2004, **11**(3): 45–47. DOI: 10.16237/j.cnki.cn44-1404/g8.2004.03.012.
- [24] POLOTOW T G, VARDARIS C V, MIHALIUC A R, *et al.* Astaxanthin Supplementation Delays Physical Exhaustion and Prevents Redox Imbalances in Plasma and Soleus Muscles of Wistar Rats[J]. *Nutrients*, 2014, **6**(12): 5819–5838. DOI: 10.3390/nu6125819.
- [25] 吴丽君, 王僮. 关于虾青素抑制运动性氧化损伤的研究[J]. *体育科技文献通报*, 2020, **28**(11): 157–159. DOI: 10.19379/j.cnki.issn.1005-0256.2020.11.062.
- WU L J, WANG T. Research on the Inhibition of Astaxanthin on Oxidative Damage Induced by Exercise[J]. *Bull Sport Sci Technol*, 2020, **28**(11): 157–159. DOI: 10.19379/j.cnki.issn.1005-0256.2020.11.062.
- [26] 邢利沙. 大蒜脂溶性成分及其生物活性的研究[D]. 天津: 天津大学, 2015.
- XING L S. Study on Fat-soluble Components of Garlic and Their Biological Activities[D]. Tianjin: Tianjin University, 2015.
- [27] ZHAI S W, WANG Y, HE Y X, *et al.* Oligomeric Proanthocyanidins Counteracts the Negative Effects of High Level of Dietary Histamine on American Eel (*Anguilla rostrata*) [J]. *Front Mar Sci*, 2020, **7**: 549145. DOI: 10.3389/fmars.2020.549145.
- [28] 曾繁强. 基于血浆代谢组学的毛鸡酒补血作用及其机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- ZENG F Q. Study on Blood-enriching Effect and Mechanism of Mao Chicken Wine Based on Plasma Metabonomics[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017.
- [29] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中S腺苷蛋氨酸合成酶基因的表达及其意义[J]. *福建医科大学学报*, 2002, **36**(2): 144–146. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4194.2002.02.007.
- CHEN G, LIN L X, ZHUANG W T, *et al.* Expression of S-adenosylmethionine Synthetase Gene in Myocardial Tissue of Diabetic Cardiomyopathy Rats and Its Significance[J]. *J Fujian Med Univ*, 2002, **36**(2): 144–146. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4194.2002.02.007.
- [30] WANG S T, CHEN H W, SHEEN L Y, *et al.* Methionine and Cysteine Affect Glutathione Level, Glutathione-related Enzyme Activities and the Expression of Glutathione S-transferase Isozymes in Rat Hepatocytes[J]. *J Nutr*, 1997, **127**(11): 2135–2141. DOI: 10.1093/jn/127.11.2135.
- [31] 朱禧星. 现代糖尿病学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000.
- ZHU X X. Modern diabetes[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 2000.
- [32] SONG Z Y, ZHOU Z X, SONG M, *et al.* Alcohol-induced S-adenosylhomocysteine Accumulation in the Liver Sensitizes to TNF Hepatotoxicity: Possible Involvement of Mitochondrial S-adenosylmethionine Transport[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, **74**(3): 521–531. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.005.
- [33] WATSON W H, BURKE T J, DOLL M A, *et al.* S-adenosylhomocysteine Inhibits NF- $\kappa$ B-mediated Gene Expression in Hepatocytes and Confers Sensitivity to TNF Cytotoxicity[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, **38**(4): 889–896. DOI: 10.1111/acer.12315.
- [34] RAMBALDI A, GLUUD C. WITHDRAWN: S-adenosyl-L-methionine for Alcoholic Liver Diseases[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, **2015**(11): CD002235. DOI: 10.1002/14651858.CD002235.pub3.
- [35] 崔畅婉, 孙峥嵘. 3-磷酸甘油酸脱氢酶促进丝氨酸合成在肿瘤进展中的机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, **29**(5): 885–888. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.05.037.
- CUI C W, SUN Z R. The Mechanism of 3-phosphoglycerate Dehydrogenase Promoting Serine Synthesis in Tumor Progression[J]. *J Mod Oncol*, 2021, **29**(5): 885–888. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2021.05.037.