



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.010
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.010
China Journal of General Surgery, 2023, 32(12):1908-1918.

· 基础研究 ·

人脐带间充质干细胞改善小鼠下肢缺血机制的代谢组学分析

周梦蝶¹, 王赞², 张敏³, 李志红³, 谢晓云², 朱建华³

(1. 同济大学附属养志康复医院 老年科, 上海201619; 2. 同济大学附属上海市第十人民医院 介入血管外科, 上海200072; 3. 上海健康医学院附属周浦医院 普通外科, 上海201318)

摘要

背景与目的: 外周血管疾病 (PAD) 是因各种原因所致血流灌注不足而引发的疾病, 部分患者无法手术。近年来, 干细胞移植开始应用于 PAD 的治疗, 并取得了一定的效果。然而目前尚未见其作用机制涉及代谢方面的研究。因此, 本研究利用液相色谱-质谱 (LC-MS) 代谢组学初步探讨人脐带间充质干细胞 (HUCMSC) 促进下肢缺血组织修复中所涉及的代谢通路及代谢分子, 并重点分析酸性鞘磷脂酶 (ASM)-神经酰胺 (Cer) 代谢途径的变化。

方法: 从人脐带组织中分离获得 HUCMSC, 培养扩增后用流式细胞术鉴定其表面分子标记。8 周龄雄性小鼠 (C57BL/6J) 采用结扎并离断其左侧下肢股动脉、股静脉的方法制备下肢缺血模型, 将造模后的小鼠随机均分为两组, 分别于缺血侧下肢局部注射 HUCMSC 混悬液 (HUCMSC 组) 与 PBS (对照组)。分别在术后 3、7、14 d, 取两组小鼠缺血侧腓肠肌组织, 行 HE 染色与 Masson 染色, 观察两组小鼠缺血肌肉的形态学变化; 行 LC-MS 检测, 并结合 KEGG 数据库分析, 比较两组肌肉组织的代谢组学差异。

结果: 分离获得的 HUCMSC 高表达 CD105、CD90、CD73, 低表达 HLA-DR、CD14、CD19、CD34。形态学观察显示, 与对照组相比, HUCMSC 组术后 7、14 d 肌肉萎缩与纤维化程度均较对照组明显改善。两组术后 3、7、14 d 的腓肠肌样本的非靶向代谢组学检测共鉴定出 687 种代谢物, 其中脂类相关物质占比最大 (34.088%)。负离子模式下检测的差异代谢物共 37 种, 25 种上调, 12 种为下调; 在正离子模式下检测的差异代谢物共 17 种, 其中 11 种上调, 6 种为下调。与对照组比较, Cer 明显下调 (FC=0.43), 且 ASM/Cer 通路产物磷脂酰胆碱也明显下降 (FC=0.68)。合并两组术后 3、7 d 的腓肠肌样本的正负离子模式数据后的 KEGG 通路分析结果显示, 差异代谢物主要涉及通路有 γ -氨基丁酸能突触、精氨酸/鸟氨酸代谢、矿物质吸收、氧化磷酸化、蛋白质代谢、甘油磷脂代谢、肌动蛋白细胞骨架的调节等。

结论: 在 HUCMSC 促进小鼠下肢缺血损伤的修复中, 脂类代谢产物的变化发挥了重要作用, 其中部分机制可能与 HUCMSC 抑制 ASM/Cer 代谢途径有关。

关键词

外周血管疾病; 间质干细胞; 神经酰胺类; 代谢组学

中图分类号: R543

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82072024); 上海市自然科学基金资助项目 (18ZR1433700)。

收稿日期: 2023-10-17; **修订日期:** 2023-12-05。

作者简介: 周梦蝶, 同济大学附属养志康复医院住院医师, 主要从事 2 型糖尿病周围血管疾病方面的研究。

通信作者: 朱建华, Email: zjh8888@163.com

Metabolomic analysis of the mechanisms for human umbilical cord mesenchymal stem cells improving lower limb ischemia in mice

ZHOU Mengdie¹, WANG Zan², ZHANG Min³, LI Zhihong³, XIE Xiaoyun², ZHU Jianhua³

(1. Department of Geriatrics, Shanghai Yangzhi Rehabilitation Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 201619, China;

2. Department of Interventional and Vascular Surgery, Shanghai Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai

200072, China; 3. Department of General Surgery, Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract

Background and Aims: Peripheral arterial disease (PAD) is a condition characterized by insufficient blood flow due to various reasons, and some patients are not suitable for surgery. In recent years, stem cell transplantation has been used in the treatment of PAD, showing promising results. However, the metabolic mechanisms involved in its therapeutic effects remain unclear. This study was conducted to investigate the metabolic pathways and molecules involved in the repair of lower limb ischemic tissue by human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) metabolomics, with a specific focus on changes in the acid sphingomyelinase (ASM)-ceramide (Cer) metabolic pathway.

Methods: HUCMSCs were isolated from human umbilical cord tissue, expanded in culture, and characterized using flow cytometry for surface molecular markers. A mouse model of lower limb ischemia was created by ligating and excising the left femoral artery and vein in 8-week-old male C57BL/6J mice. Then, the mice were randomly divided into two groups, with one group receiving local injection of HUCMSCs suspension (HUCMSCs group) and the other receiving PBS (control group). Muscle tissues from the ischemic limb were collected at 3, 7, and 14 d after surgery. HE staining and Masson staining were performed to observe morphological changes. LC-MS analysis was conducted in combination with KEGG database analysis to compare the metabolomic differences between the two groups.

Results: HUCMSCs expressed high levels of CD105, CD90, and CD73, and low levels of HLA-DR, CD14, CD19, and CD34. Morphological observations revealed a significant improvement in muscle atrophy and fibrosis in the HUCMSCs group compared to the control group at 7 and 14 d after surgery. Non-targeted metabolomic analysis identified 687 metabolites in the gastrocnemius muscle samples, with lipids representing the largest proportion (34.088%). Differential metabolites included 37 in negative ion mode (25 upregulated, 12 downregulated) and 17 in positive ion mode (11 upregulated, 6 downregulated). Cer was significantly downregulated (FC=0.43), and the phosphatidylcholine product of the ASM/Cer pathway also decreased (FC=0.68) compared to the control group. KEGG pathway analysis of combined positive and negative ion mode data from gastrocnemius muscle samples at 3 and 7 d after surgery revealed involvement in pathways such as γ -aminobutyric acid-ergic synapse, arginine/proline metabolism, mineral absorption, oxidative phosphorylation, protein metabolism, glycerophospholipid metabolism, and regulation of the actin cytoskeleton.

Conclusion: Changes in lipid metabolism play a crucial role in the repair of lower limb ischemic injury promoted by HUCMSCs, with some mechanisms potentially associated with the inhibition of the ASM/Cer pathway.

Key words

Peripheral Vascular Diseases; Mesenchymal Stem Cells; Ceramides; Metabolomics

CLC number: R543

外周血管疾病 (peripheral artery disease, PAD) 是外周动脉因动脉粥样硬化、糖尿病性血管病变或者血栓闭塞性脉管炎引起的血流灌注不足所引发的一类疾病, 以双下肢多见^[1]。早诊断、早处理是治疗的关键, 但仍有超过30%的患者因血管受累严重或手术风险而无法手术, 其中炎性血管病变患者截肢率高达77.8%^[2]。近几年, 干细胞移植作为新兴治疗手段开始应用于PAD的治疗, 并取得了一定的效果^[3]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是一种具有多种不同的分化能力和低免疫原性的细胞群, 它能够转移并且定向到受损部位并在其血管处归巢^[4], 其表面可以表达细胞因子, 例如: CD166、CD102、CD54及CD46 (α 整联蛋白) 等, 在细胞与细胞之间的也可以起到很好的调节与相互作用, 其中人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSC) 可治疗PAD引起的组织损伤, 改善血供, 具有良好的临床应用前景^[5], 目前有关其机制研究较多, 但聚焦于代谢方面的研究暂未见报道。酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASM) - 神经酰胺 (ceramide, Cer) 代谢途径是调控细胞增殖、凋亡和细胞表型的关键途径, 与动脉粥样硬化^[6]、缺血再灌注损伤^[7]、代谢类疾病^[8]、重度抑郁症^[9]等疾病的发生、发展有密切关系。但目前尚不清楚在HUCMSC改善PAD中ASM/Cer途径是否发生变化。本研究基于以上背景, 运用液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 技术进行非靶向代谢组学研究, 初步探讨HUCMSC在改善小鼠下肢缺血的代谢特征, 筛出有效的代谢产物, 并重点分析ASM/Cer代谢途径的变化。

1 材料与方法

1.1 主要材料

乙二胺四乙酸 (EDTA, Sigma-Aldrich, 美国), 磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 粉末, MASSON 染液, 乙腈, 乙酸铵, 甲醇, 4% 多聚甲醛溶液, 戊巴比妥钠, FITC-CD14 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 美国), FITC-CD19 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 美国), FITC-CD34 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 美国), PE-CD73 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 美国), PE-CD79 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 美国), PE-CD105 单克隆抗体

(BD Pharmingen, 美国), 流式细胞仪 (Countstar, 中国), YHT101 红外电子温度计 (鱼跃, 中国), PowerPac™ 通用电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 超声波细胞破碎仪 (JY88-II, 中国), 色谱柱 (Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm column, 中国), AB Triple TOF 6600 质谱仪 (AB SCIEX, 中国), Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 (Agilent, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 HUCMSC 的分离、培养和流式细胞仪鉴定
脐带样本的收集均获得产妇及其家属知情同意, 并伦理审批。入库样本排除严重的家族病史/遗传病史, 无血液疾病史、产妇无HBV、HCV、HIV、梅毒螺旋体等传染性疾病的既往史或感染状态, 胎儿Apgar评分10分, 羊水无胎粪污染, 脐带状态良好。无菌条件下, 将脐带从采集瓶中夹出, 放进装有适量氯化钠注射液的150 mm培养皿中。剪取10 cm左右的脐带组织 (中间部分), 洗净PBS至清澈, 将脐带剪成2~3 cm的小段。用止血钳夹住脐带一端横截面端部组织, 带钩有齿镊去除暴露的动静脉以及脐带的外膜组织。将收集到的Walton胶加入氯化钠注射液清洗10次。放入新的50 mL离心管中, 用剪刀充分剪碎成体积为1~2 mm³的小块, 用巴氏吸管吸取0.5 mL左右的Walton胶平铺于75 cm²培养瓶底部。期间定期观察更换培养基。融合度在80%以上时, 可以考虑收获传代。并通过流式细胞仪进行表面标志物鉴定 (阳性标志物CD105、CD90、CD73, 阴性标志物: HLA-DR、CD14、CD19、CD34)。

1.2.2 小鼠下肢缺血模型的构建和HUCMSC移植
SPF级8周龄大小健康的雄性C57BL/6J小鼠30只 (南方模式动物中心采购), 平均体质量为(25 \pm 3) g。该实验已获得实验动物护理和伦理委员会的批准。两组随机分配标记。小鼠1%的戊巴比妥钠按照50 mg/kg的剂量进行腹腔注射麻醉, 并在左侧腹股沟韧带处做1 cm的纵行切口, 分离股神经血管鞘。将股动脉、股静脉及其分支进行顺序分离, 用6-0缝线在股浅动脉、股浅静脉、腘动脉及腘静脉的近端结扎, 在大隐动脉和大隐静脉的末端, 将其结扎后, 将其离体, 创面使用棉签再次消毒后, 将小鼠卧位放置于笼内, 待苏醒后放回, 用多普勒血流仪观察小鼠肢体缺血情况, 血流阻断说明建模成功 (图1)。HUCMSC组小鼠选取左下肢沿股

动脉的方向取5个点,点间距约0.3 cm×0.3 cm,肌注HUCMSC混悬液(细胞总量为 1×10^6 个/只,共100 μ L),对照组使用相同剂量的PBS。切口分层封闭缝合。在建立小鼠下肢缺血模型后,分别在术后3、7、14 d取两组小鼠($n=5$)实验侧腓肠肌进行4%多聚福尔马林和液氮保存。福尔马林固定组依次经过70%乙醇60 min,80%乙醇60 min,95%乙醇35 min×2次,100%乙醇30 min,异丁醇+100%乙醇(1:1)45 min,异丁醇12 h,正丁醇4 h脱水,放入60 $^{\circ}$ C的温箱中充分浸蜡,切片5 μ m,蒸馏水展开,37 $^{\circ}$ C的保温箱中过夜后进行HE染色和Masson染色。

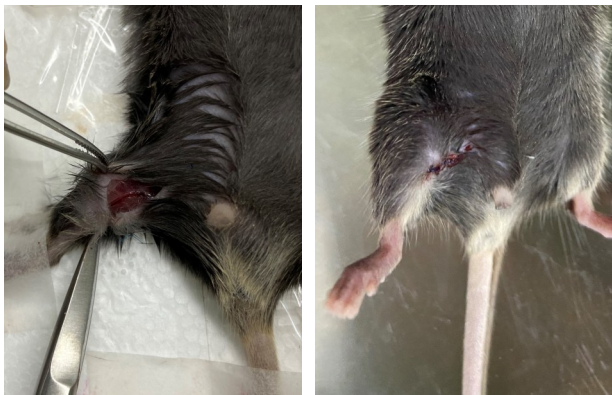


图1 小鼠下肢缺血模型制备

Figure 1 Preparation of mouse lower limb ischemia model

1.2.3 基于LC-MS的HUCMSC治疗作用的代谢组学分析 在80 mg样本中加入1 mL冷萃溶剂甲醇/乙腈/纯水(2:2:1, v/v/v)涡旋混合,裂解液经MP均质器(24×2, 6.0 m/s, 60 s, 2次)匀浆,4 $^{\circ}$ C超声低温超声30 min,-20 $^{\circ}$ C静置10 min,14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心20 min,取上清4 $^{\circ}$ C真空干燥,在LC-MS中添加100 μ L的乙腈溶液(乙腈:水=1:1, v/v)重新溶解,取上清液进样分析。利用TripleTOF6600质谱仪,利用正负离子模型(ESI),实现对不同类型化合物的非靶向代谢组学研究。用Agilent1290 InfinitLC HILIC柱子(2.1 mm×100 mm,颗粒直径1.7 μ m)对样品进行液相色谱分析。色谱柱温度25 $^{\circ}$ C;流速0.5 mL/min;进样量2 μ L;流动相组成A:水+25 mmol/L乙酸铵+25 mmol/L氨水,B:乙腈;梯度1 min为85% B,11 min线性降至65%,0.1 min降至40%,保持4 min,0.1 min增加至85%,再平衡时间为5 min。流速0.4 mL/min、

25 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、2 μ L。质谱以正负两种方式运行。ESI源的条件是:离子源气体1(Gas1)为60,离子源气体2(Gas2)为60,帘气(CUR)为30,源温度600 $^{\circ}$ C,离子喷射电压浮动 ± 5 500 V。将仪器设定在60~1 000 da的质核比(m/z)范围,将TOF质谱的累积时间设定为0.20 s/spectra。其中,采用25~1 000 da的m/z采样,产物离子扫描积累时间设置为0.05 s/spectra。产品离子扫描采用了高灵敏度的方法,采用了IDA方法。参数设置如下:碰撞能量(CE)固定为35 V \pm 15 eV;散簇电位(DP),60 v (+)和-60 v (-);排除4 Da以内的同位素。

1.3 统计学处理

数据统计使用SPSS 20.0软件。结果采用计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。非靶代谢统计分析先将原始数据通过ProteoWizard从Wiff格式转化成mzXML,并利用XCMS软件对其进行了预处理,对峰对齐,保留时间校正,峰面积进行了提取。再对得到的数据行以下步骤:首先进行代谢物结构鉴定、数据预处理,其次做实验数据质量评价,最后数据分析。数据分析主要有:一元统计分析、多维统计分析、差异性代谢产物筛选、差异性代谢产物的关联性分析、京都基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析。

2 结果

2.1 HUCMSC的分离和鉴定

经流式细胞仪鉴定,通过识别细胞表面标志物,对HUCMSC进行表型检测,分析其免疫学表型。结果发现,在HUCMSC的表面有CD105、CD90、CD73的表达,而没有HLA-DR、CD14、CD19、CD34等因子的表达,证实该细胞符合国际细胞治疗学会的标准(图2)。

2.2 形态学分析

HE染色结果显示,相对对照组,HUCMSC组可见骨骼肌纤维排列整齐,肌节清晰可见(图3A);Masson染色结果显示,骨骼肌纤维含量明显高于对照组,而胶原纤维含量明显低于对照组(均 $P < 0.05$)(图3B)。

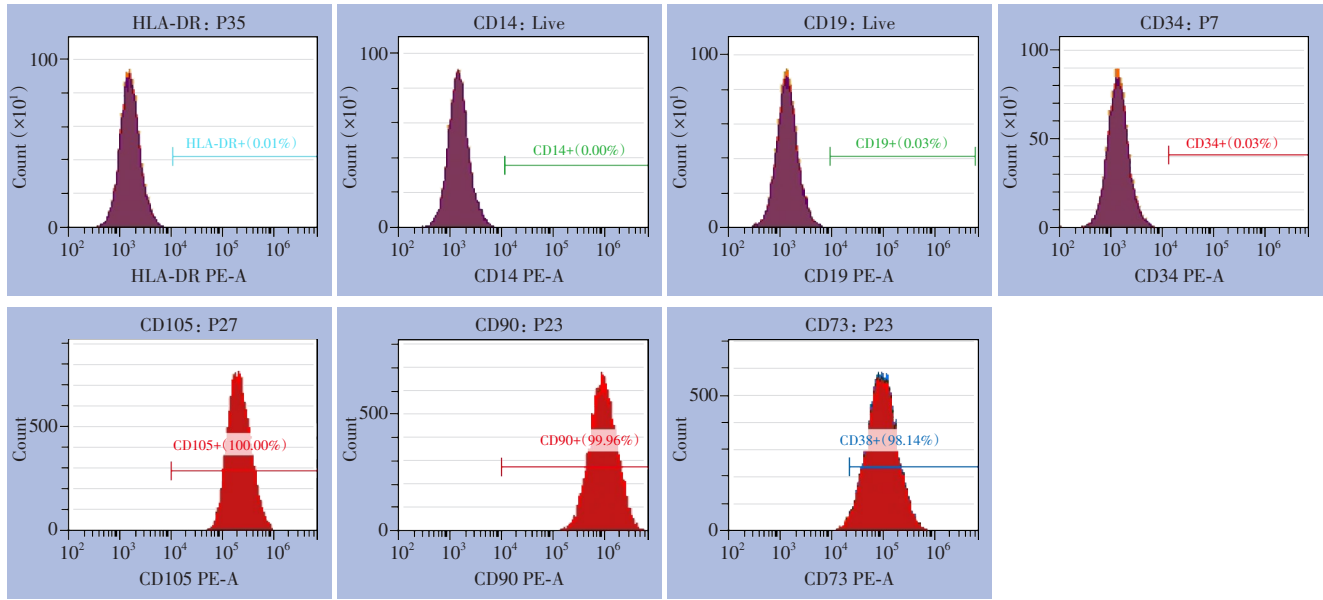


图2 流式细胞术鉴定结果 (横坐标为相对荧光强度, 纵坐标为细胞数)

Figure 2 Flow cytometry identification results (X-axis represents relative fluorescence intensity, Y-axis represents cell count)

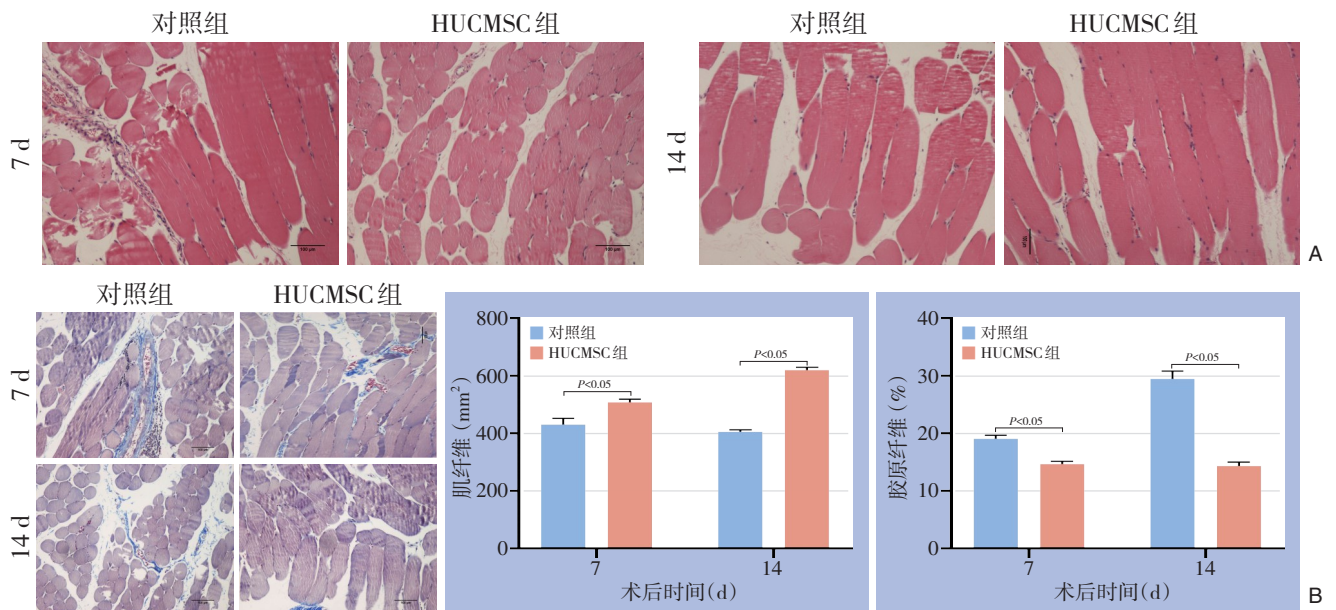


图3 缺血侧腓肠肌组织形态学观察 A: HE染色 (×100); B: Masson染色 (×100)

Figure 3 Morphological observation of gastrocnemius muscle tissue on the ischemic side A: HE staining (×100); B: Masson staining (×100)

2.3 基于LC-MS的HUCMSC治疗作用的代谢组学分析

2.3.1 代谢物数量统计和化学分类归属统计 正负离子模式合并后共鉴定 687 种代谢物, 其中正离子

模式 337 种, 负离子模式 350 种, 根据其化学分类归属信息进行分类统计, 各类代谢物数量所占比例如图 4 所示, 脂类物质所占比最高, 为 34.088%, 其次为有机酸及其衍生物类 (22.489%)。

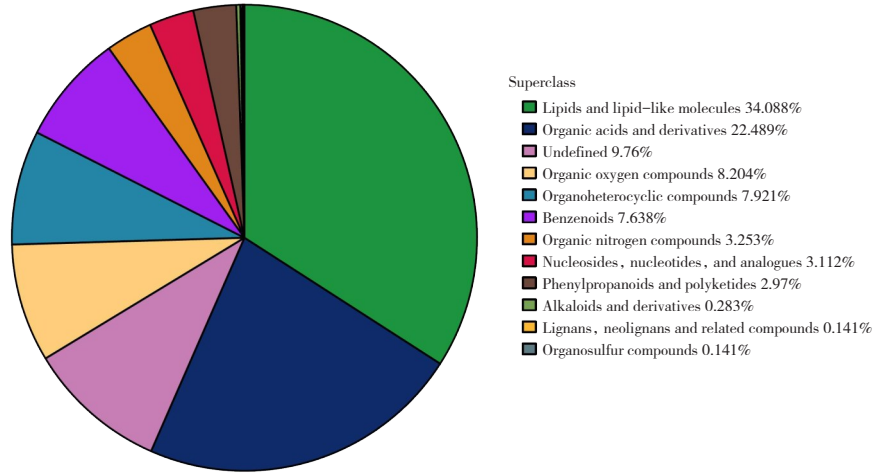


图 4 鉴定的代谢物在各化学分类的数量占比 (不同颜色的色块代表不同的化学分类归属条目, 百分比代表该化学分类归属条目中的代谢物数量占所有鉴定到的代谢物数量的百分比)

Figure 4 Proportion of identified metabolites in each chemical classification (different colored blocks represent different items of chemical classification, and the percentage indicates the proportion of metabolites in each chemical classification item relative to the total number of identified metabolites)

2.3.2 正、负离子模式下差异代谢物 利用 OPLS-DA 模型得到的变量权重值 (VIP), 通常 VIP>1 的代谢产物在模型说明中被认为贡献显著, 以 OPLS-DA VIP>1 和 $P<0.05$ 为差异代谢物筛选标准。在负离子模式下检测的差异代谢物共 37 种, 25 种上调[差异倍数 (FC) >1], 12 种为下调 (FC<1), 其中 Cer 是下调最明显的 (FC=0.43); 负离子模式下所有差异代谢物有 62.2% 为脂类物质; 在 ASM/Cer 通路中, Cer 明显下调; 神经酰胺 1-磷酸盐明显上调 (表 1)。在正离子模式下检测的差异代谢物共 17 种, 其中

11 种上调 (FC>1), 6 种下调 (FC<1); 在 ASM/Cer 通路中, 磷脂酰胆碱下调 (表 2)。

2.3.3 KEGG 通路富集分析 正负离子模式合并后, 用生物信息学方法对筛选出的具有显著差异的代谢物进行 KEGG 通路富集分析。术后第 3 天 (左) 与第 7 天 (右) 的 KEGG 富集通路气泡图 (图 5) 显示, 差异代谢物主要涉及通路有 γ -氨基丁酸能突触、精氨酸/鸟氨酸代谢、矿物质吸收、氧化磷酸化、蛋白质代谢、甘油磷脂代谢、肌动蛋白细胞骨架的调节等。

表1 负离子模式下检测的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites detected in negative ion mode

代谢物的名称	FC	VIP	P	m/z	保留时间(s)
Cer(d18:1/18:1(9Z))	0.43	1.73	0.01	562.52	36.49
Cer[ns] d36:2	0.44	1.32	0	622.54	36.51
1-stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.49	1.76	0.02	768.53	168.58
Pantetheine	0.49	2.88	0.03	277.12	68.43
Pi 40:6	0.55	3.09	0	909.55	198.58
Pe 44:11	0.6	3.35	0.01	836.53	143.89
(z)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxooxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	0.63	3.87	0.01	445.19	39.42
1,2-dilinolenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	0.64	1.03	0.04	734.48	150.1
Pc 38:7	0.68	1.87	0.02	862.56	143.98
1,2-di(4z,7z,10z,13z,16z,19z-docosaheptaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	0.69	1.31	0.05	834.51	142.08
Pe(16:1e/14-hdohe)	0.69	8.29	0	762.51	148.23
Pc(16:1e/17-hdohe)	0.71	7.31	0.04	864.58	144.49
Pg 34:3	1.34	1.9	0.04	743.49	39.61
1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	1.35	2.69	0	745.5	39.86
Pg 34:3	1.35	1.05	0.05	743.49	39.61
1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol	1.54	6.75	0.02	747.52	40.26
Ile-Pro	1.57	1.28	0.01	227.07	117.56
Phe-met-arg-phe-amide	1.65	1.08	0.04	597.31	175.68
DL-threonine	1.79	1.32	0.04	118.05	378.03
N-acetyl-l-methionine	1.81	2.04	0.04	190.05	207.64
1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)	1.85	1.19	0	797.54	69.5
1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	1.86	1.03	0.03	742.54	107.09
1-stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1.87	1.19	0.04	768.53	168.58
Glycine	1.91	1.15	0.04	74.02	378.13
Pg 38:6	1.91	3.02	0.02	793.5	39.11
Succinate	1.96	2.39	0.04	117.02	85.2
2-arachidonoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	2.05	2.48	0.04	738.51	150.14
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-l-serine	2.86	4.9	0.01	773.53	76.22
Uric acid	2.92	1.32	0.05	167.02	204.07
Succinate	2.97	2.15	0.05	117.02	85.2
4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	2.99	1.56	0.04	237.09	186.94
N-palmitoyl-d-erythro-dihydroceramide-1-phosphate	3.12	1.76	0.04	618.48	37.24
Pi 34:2	3.69	1.11	0.04	833.5	39.4
N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	3.73	1.03	0.02	300.04	170.03
Pe(16:0e/12-hete)	3.85	1.79	0.03	740.52	107.31
Pe(16:1e/15-hete)	4.21	2.77	0	738.51	106.96
Sulfobacin b	6.69	2.23	0.01	574.45	34.14

表 2 正离子模式下检测的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites detected in positive ion mode

代谢物的名称	FC	VIP	P	m/z	保留时间(s)
Isoliquiritigenin	0.28	1.82	0.045	257.07	242.53
N-(octadecanoyl) sphing-4-enine-1-phosphocholine	0.32	4.26	0.035	731.6	183.24
1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycerol	0.6	1.17	0.002	651.53	198.28
N-arachidonoyldopamine	0.65	1.04	0.014	440.33	199.51
N-.alpha.-(tert-butoxycarbonyl)-l-histidine	0.72	1.32	0.043	110.07	428.9
2-docosahexaenoyl-1-stearoyl-sn-glycero-3-phosphoserine	0.73	1.55	0.01	836.54	201.36
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1.16	5.28	0.017	496.34	199.49
4-methylbenzyl alcohol	1.28	1.14	0.004	105.07	39.86
Heptadecaphinganine	1.35	3.67	0.005	288.29	61.47
Acetylcholine	1.38	2.08	0.043	146.12	383.64
Trigonelline	1.47	1.17	0.01	138.05	295.06
C17-sphinganine	1.53	6.19	0.026	288.29	41.71
Glycerophosphocholine	1.59	8.85	0.035	104.11	272.59
1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol	1.75	1.36	0.011	601.51	38.99
DL-arginine	1.77	2.05	0.035	175.12	409.96
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	2.15	10.63	0.027	786.6	120.17
L-methionine	2.6	1.7	0.027	150.06	301.06

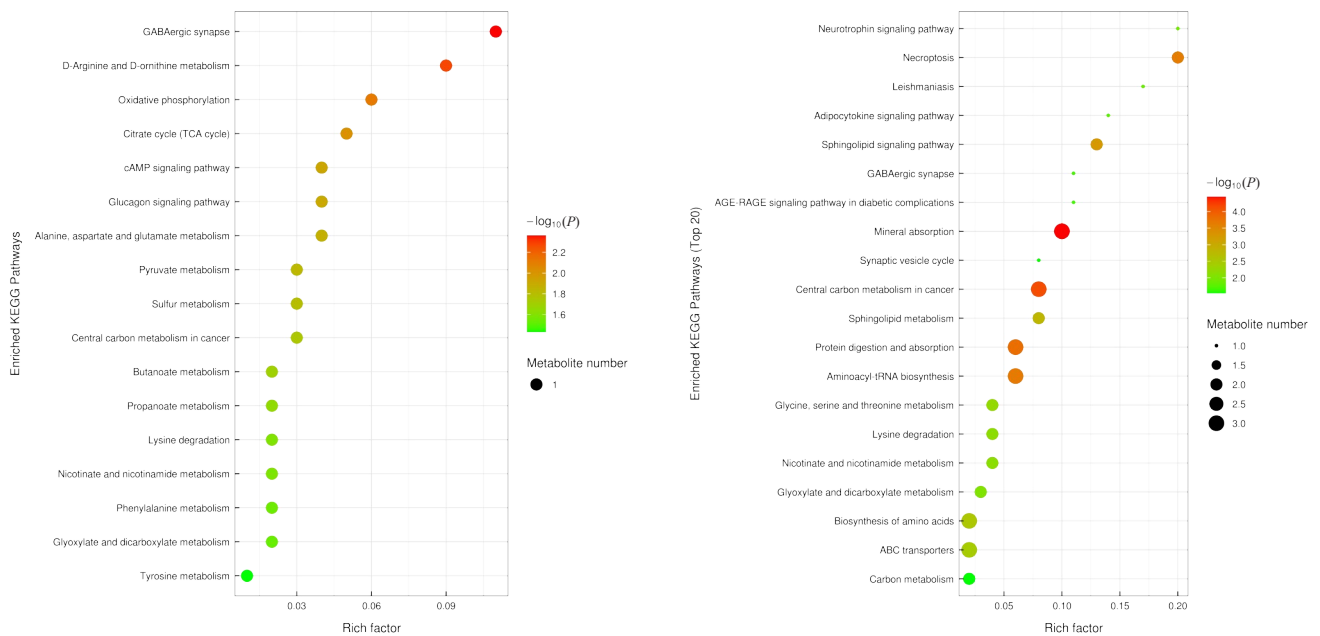


图 5 KEGG 富集通路图 (每个气泡代表 1 条代谢途径, 气泡所在横坐标和气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 气泡越大, 表明影响因子越大; 气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 P 值, 颜色越深 P 值越小, 富集含量越高)

Figure 5 KEGG enrichment pathway map (each bubble represents a metabolic pathway, with the bubble's horizontal position and size indicating the impact factor in topological analysis - the larger the bubble, the greater the impact factor; the vertical position of the bubble and its color represent the P-value in enrichment analysis - the darker the color, the smaller the P-value, indicating higher enrichment content)

3 讨论

HUCMSC具有多潜能分化特性,已有研究证实HUCMSC治疗糖尿病下肢缺血效果良好^[10],通过肌肉注射HUCMSC可促进新生侧支血管和新生微血管形成^[11],还可促进周围神经的修复^[12]。本实验中,HE染色和Masson染色显示,HUCMSC治疗后可促进小鼠缺血下肢的恢复,与相关文献研究结果相同^[13]。同时,通过KEGG数据库分析发现,HUCMSC治疗后,小鼠肌肉内精氨酸/鸟氨酸代谢变化显著。据报道^[14],HUCMSC还可通过IL-6、IL-10和TNF- α 的下调发挥抗炎作用,同时能够降低CD3⁺与CD4⁺T细胞的数目,降低CD4⁺与CD8⁺T细胞的比率,抑制NK细胞活化,以及上调Treg细胞表达。由此,HUCMSC在下肢缺血治疗中表现出良好的促进组织损伤修复功能。

本研究HUCMSC组与对照组小鼠肌肉组织所检测到代谢物中,脂类物质占34.088%,说明在其病理改变中,脂质的合成与代谢非常重要且变化显著。脂质类化合物是细胞重要组成物质,它不但是能源储存的主要物质,而且还具有非常重要的生物功能。如信号介导、免疫调节、炎症和维持体内平衡^[15-16]。磷脂是细胞膜的主要脂质成分,是释放脂质介质的重要前体^[17]。磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇是最主要的三种磷脂,在细胞内,都可通过被磷脂酶A水解产生相应的单链溶血磷脂及游离脂肪酸^[18],且通过“lands cycle”互相转换,活跃维持着脂质代谢稳态,进一步促进细胞恢复。为了更好地了解脂质在MSC抗炎特性中的作用及其潜在的作用机制,Campos等^[19]对10 ng/mL TNF- α 和500 U/mL IFN- γ 诱导的促炎条件下的MSC进行了脂质分析,发现促炎刺激下,磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂类脂质分子谱发生重大变化,而磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸的表达同时降低。也有多项研究证实MSC的抗炎特性与脂质代谢相关^[20-21]。

ASM分解鞘磷脂产生Cer,即ASM/Cer通路是调控细胞增殖、迁移、凋亡及炎症反应的重要通路^[22-25],Cer通过激活一系列蛋白激酶启动胞内磷酸化过程,参与多种细胞生物学活动如诱导细胞凋亡、改变胞膜通透性并引发各种疾病。这一通路在心血管系统的正常生理功能和病理发生发展

过程中都发挥了极其重要的作用^[26-27]。已有研究^[28-29]证实,ASM/Cer通路在动脉硬化病理过程中起重要作用,且与心血管不良事件发生相关。本实验下肢缺血模型小鼠在HUCMSC干预后,Cer下降显著,且ASM/Cer通路产物磷脂酰胆碱也显著下降。在Cer代谢通路中,Cer经神经酰胺激酶作用,可分解为神经酰胺1-磷酸盐,神经酰胺1-磷酸盐是参与细胞更新、免疫反应和炎症级联反应的信号介质,本实验结果中也检测到了神经酰胺1-磷酸盐的上调。神经酰胺1-磷酸盐可与SIP通过受体使促使降解的巨噬细胞迁移至炎症部位^[30]。且神经酰胺1-磷酸盐可作为信号分子或ASM的抑制剂调控巨噬细胞阻断细胞凋亡^[31]。基于上述研究,笔者推测:下肢缺血模型小鼠经HUCMSC移植治疗后,其下肢肌肉ASM/Cer通路发生改变,通过抑制Cer的合成,促进其分解,从而调控细胞表型抑制肌细胞凋亡改善小鼠下肢缺血。

同时在本研究中,正负离子模式合并后KEGG通路分析结果显示,差异代谢物主要涉及通路有 γ -氨基丁酸能突触、精氨酸鸟氨酸代谢、矿物质吸收、氧化磷酸化、蛋白质代谢、甘油磷脂代谢、肌动蛋白细胞骨架的调节等。根据KEGG富集通路结果看,HUCMSC治疗后相较于对照组,小鼠下肢肌肉的各种代谢更活跃。在这个过程中,精氨酸水解酶会把精氨酸水解为鸟氨酸。人体内的氨基酸会发生代谢反应,首先会产生氨,然后经过鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸等,最后会形成尿素,这就是所谓的鸟氨酸循环。在本实验下肢缺血小鼠模型中,经HUCMSC移植治疗后的小鼠肌肉内精氨酸/鸟氨酸代谢变化显著,这一变化是否涉及MSC发挥修复作用的机制值得进一步研究。

本研究仍存在不足,有关Cer的合成与分解通路众多,本研究取ASM/Cer代谢通路作为重点关注部分,需进一步实验验证其作用及对血管生成的影响。HUCMSC对下肢肌肉的保护作用已明确,但有关其机制众说纷纭,本研究虽从代谢组学方向分析,但所涉及物质种类繁多,脂类代谢分析仍需进一步的深化,需要更多靶向或非靶向代谢组学的研究。

综上,本研究结果提示,脂类代谢产物的变化在HUCMSC促进下肢缺血损伤的修复中发挥重要作用,其中部分机制可能与HUCMSC抑制ASM/Cer代谢途径有关。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:谢晓云、周梦蝶负责构思与设计;李志红、王赞负责提供研究材料及试验操作;朱建华、张敏负责数据收集和处理;周梦蝶、朱建华负责数据分析和解释、手稿写作;所有作者均审核并批准手稿。

参考文献

- [1] Kolte D, Parikh SA, Piazza G, et al. Vascular teams in peripheral vascular disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(19):2477-2486. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.463.
- [2] 李振振,曾昭凡,肖占祥,等.急性下肢缺血的治疗策略:附62例报告[J].*中国普通外科杂志*, 2015, 24(12):1691-1695. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.011.
Li ZZ, Zeng ZF, Xiao ZX, et al. Treatment strategy for acute lower limb ischemia: a report of 62 cases[J]. *China Journal of General Surgery*, 2015, 24(12):1691-1695. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.011.
- [3] 谢保城,王清辉,许周媚,等.自体干细胞移植联合血管成形术治疗糖尿病足或肢体缺血性疾病的系统评价[J].*中国普通外科杂志*, 2017, 26(12):1589-1598. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.013.
Xie BC, Wang QH, Xu ZM, et al. Systematical evaluation of autologous stem cell transplantation combined with angioplasty therapy in treatment of diabetic foot or limb ischemia[J]. *China Journal of General Surgery*, 2017, 26(12):1589-1598. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.013.
- [4] 黄东琳,梁至洁,朱丹丹,等.基质细胞衍生因子1 α 诱导脂肪来源干细胞迁移促进糖尿病缺血下肢肌肉修复的实验研究[J].*中国普通外科杂志*, 2023, 32(6):878-887. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009.
Huang DL, Liang ZJ, Zhu DD, et al. Experimental study of stromal cell-derived factor 1 α inducing migration of adipose-derived stem cells to promote muscle repair in diabetic ischemic lower limbs[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(6):878-887. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009.
- [5] Raman N, Imran SAM, Ahmad Amin Noordin KB, et al. Mechanotransduction of mesenchymal stem cells (MSCs) during cardiomyocytes differentiation[J]. *Heliyon*, 2022, 8(11): e11624. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11624.
- [6] Wong ML, Xie B, Beatini N, et al. Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(15):8681-8686. doi: 10.1073/pnas.150098097.
- [7] Jiang Y, He XX, Simonaro CM, et al. Acid ceramidase protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating sphingolipid metabolism and reducing inflammation and oxidative stress[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:633657. doi: 10.3389/fcell.2021.633657.
- [8] Cui JH, Engelman RM, Maulik N, et al. Role of ceramide in ischemic preconditioning[J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 198(5):770-777. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2003.12.016.
- [9] Chen SJ, Gao CC, Lv QY, et al. Sortilin deletion in the prefrontal cortex and hippocampus ameliorates depressive-like behaviors in mice via regulating ASM/ceramide signaling[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(8):1940-1954. doi: 10.1038/s41401-021-00823-0.
- [10] Yang SS, Kim NR, Park KB, et al. A phase I study of human cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with peripheral arterial occlusive disease[J]. *Int J Stem Cells*, 2013, 6(1):37-44. doi: 10.15283/ijsc.2013.6.1.37.
- [11] Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(3):289-306. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.10.014.
- [12] Chen S, Zhang W, Wang JM, et al. Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(1):41-47. doi: 10.18240/ijo.2016.01.07.
- [13] García-Vázquez MD, Herrero de la Parte B, García-Alonso I, et al. Analysis of biological properties of human adult mesenchymal stem cells and their effect on mouse hind limb ischemia[J]. *J Vasc Res*, 2019, 56(2):77-91. doi: 10.1159/000498919.
- [14] 胡青林,黄平平.间充质干细胞治疗糖尿病下肢缺血研究进展[J].*中华细胞与干细胞杂志:电子版*, 2021, 11(4):246-250. doi: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2021.04.008.
Hu QL, Huang PP. Advances in mesenchymal stem cells in treatment of diabetic lower limb ischemia[J]. *Chinese Journal of Cell and Stem Cell: Electronic Edition*, 2021, 11(4):246-250. doi: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2021.04.008.
- [15] Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49:123-150. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616.[PubMed]
- [16] Leuti A, Fazio D, Fava M, et al. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159:133-169. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.028.
- [17] Makide K, Kitamura H, Sato Y, et al. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009, 89(3/4):135-139. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2009.04.009.

- [18] Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2):162-176. doi: 10.1038/nrm2335.
- [19] Campos AM, Maciel E, Moreira AS, et al. Lipidomics of mesenchymal stromal cells: understanding the adaptation of phospholipid profile in response to pro-inflammatory cytokines[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(5):1024-1032. doi: 10.1002/jcp.25191.
- [20] Cunningham TJ, Yao L, Lucena A. Product inhibition of secreted phospholipase A2 may explain lysophosphatidylcholines' unexpected therapeutic properties[J]. *J Inflamm*, 2008, 5(1):1-10. doi: 10.1186/1476-9255-5-17.
- [21] Chen G, Li J, Qiang X, et al. Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis[J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(4):623-627. doi: 10.1194/jlr.C400018-JLR200.
- [22] Zeidan YH, Hannun YA. The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(5): 454-466. doi: 10.2174/156652410791608225.
- [23] Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases[J]. *FASEB J*, 2008, 22(10): 3419-3431. doi: 10.1096/fj.08-108043.
- [24] Schuchman EH. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009, 47(Suppl 1): S48-57. doi: 10.5414/cpp47048.
- [25] Schuchman EH. Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(9):1895-1900. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.083.
- [26] 潘玮, 石瑞正, 张国刚. 酸性鞘磷脂酶和心血管疾病的研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2011, 16(3):233-234. doi: 10.3969/j.issn.1007-5410.2011.03.022.
- Pan W, Shi RZ, Zhang GG. Research progress of acid sphingomyelinase and cardiovascular diseases[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Medicine*, 2011, 16(3):233-234. doi: 10.3969/j.issn.1007-5410.2011.03.022.
- [27] 何兴轩, Schuchman EH. 酸性鞘磷脂酶在环境健康中的潜在作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2012, 37(2):109-125. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.02.001.
- He XX, Schuchman EH. Potential role of acid sphingomyelinase in environmental health[J]. *Journal of Central South University: Medical Science*, 2012, 37(2): 109-125. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2012.02.001.
- [28] Mantovani A, Dugo C. Ceramides and risk of major adverse cardiovascular events: a meta-analysis of longitudinal studies[J]. *J Clin Lipidol*, 2020, 14(2):176-185. doi: 10.1016/j.jacl.2020.01.005.
- [29] Peterson LR, Xanthakis V, Duncan MS, et al. Ceramide remodeling and risk of cardiovascular events and mortality[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(10):e007931. doi: 10.1161/JAHA.117.007931.
- [30] Weichand B, Weis N, Weigert A, et al. Apoptotic cells enhance sphingosine-1-phosphate receptor 1 dependent macrophage migration[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(12): 3306-3313. doi: 10.1002/eji.201343441.
- [31] Gómez-Muñoz A, Kong JY, Salh B, et al. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(1):99-105. doi: 10.1194/jlr.M300158-JLR200.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:周梦蝶,王赞,张敏,等.人脐带间充质干细胞改善小鼠下肢缺血机制的代谢组学分析[J].中国普通外科杂志,2023,32(12):1908-1918. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.010

Cite this article as: Zhou MD, Wang Z, Zhang M, et al. Metabolomic analysis of the mechanisms for human umbilical cord mesenchymal stem cells improving lower limb ischemia in mice[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(12):1908-1918. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.010