

· 方药研究 ·

芎芪合剂对脑缺血再灌注损伤大鼠兴奋性氨基酸含量及代谢组学的影响

付 于¹ 夏 天¹ 颜贤忠² 黄 燕³ 黄培新³

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市鞍山西道314号, 300193;

2. 国家生物医学分析中心; 3. 广东省中医院)

[摘要] **目的** 从兴奋性氨基酸及代谢组学的角度, 探讨芎芪合剂抗溶栓后脑缺血再灌注损伤的整体作用机理。**方法** 建立SD大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型, 模拟溶栓成功后的再灌注。分为假手术组、模型组、尿激酶组、芎芪合剂组、尿激酶加芎芪合剂组, 每组30只。运用组织生化及核磁共振(NMR)代谢组学的方法, 测定兴奋性氨基酸含量和血浆代谢组学相关指标。**结果** 芎芪合剂能够抑制MCAO大鼠缺血再灌注引起的缺血侧脑组织兴奋性氨基酸谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)含量的增高($P < 0.05$), 并使之趋向于正常; 代谢组学检测结果显示, 芎芪合剂能抑制MCAO大鼠缺血再灌注引起的血浆谷氨酸以及乳酸、肌酸、胆碱代谢水平的升高和苏氨酸、丙氨酸以及血糖代谢水平的减低($P < 0.05$)。**结论** 芎芪合剂能够调节大鼠缺血再灌注后的代谢平衡, 从而起到抗脑缺血再灌注损伤的作用。

[关键词] 芎芪合剂; 脑缺血; 再灌注损伤; 兴奋性氨基酸; 代谢组学

Effect of Xiongqi Mixture on Excitatory Amino Acid and Metabonomics after Cerebral Ischemical Reperfusion Injury of MCAO Rats

FU Yu¹, XIA Tian¹, YAN Xianzhong², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. National Center of Biomedical Analysis; 3. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Xiongqi Mixture (Mixture of Rhizome Chuanxiong and Radix Astragali) resisting cerebral ischemical reperfusion injury after thrombolysis from the aspects of excitatory amino acid and metabonomics. **Methods**

The middle cerebral artery occlusion (MCAO) models of SD rats were set up and reperfusion was carried out after thrombolysis. The rats were randomized into normal control group, physiological saline control group, urekinase treatment group, Xiongqi Mixture treatment group, and urekinase + Xiongqi Mixture treatment group, with 30 rats in each group. The histological biochemistry and NMR-based metabonomics methods were used for detecting the excitatory amino acid and plasma metabonomics indexes. **Results** Xiongqi Mixture could inhibit the increase of Glu and Asp caused by reperfusion of MCAO rats with cerebral ischemia ($P < 0.05$), making them tend to normal. The metabonomics detection showed that Xiongqi Mixture could inhibit the increase of plasma glutamate, lactate, creatine, choline and the decrease of threonine, alanine and blood glucose metabolism ($P < 0.05$). **Conclusion** Xiongqi Mixture can regulate the metabolism of MCAO rats with cerebral ischemia after reperfusion from the diseased condition, resisting the reperfusion injury.

Key Words Xiongqi Mixture; Cerebral ischemia; Reperfusion injury; Excitatory toxicity; Metabonomics

芎芪合剂是基于王永炎院士的临证经验, 选取益气活血中药(黄芪、赤芍、川芎)的有效成分配伍组成的中药复方, 预实验结果显示, 其能显著减少大鼠缺血再灌注侧脑组织梗死面积, 其机制有待研究。代谢组学(metabonomics)揭示新陈代谢动态进程中代谢产物的变化规律, 可全面理解病理变化过程及机体内物质的代谢途径^[1], 兴奋性氨基酸(EAAs)在缺血再灌注损伤

中发挥着重要作用^[2], 因此, 本研究通过分析芎芪合剂对尿激酶溶栓状态下血浆代谢组学的影响, 探讨其代谢产物与溶栓后缺血再灌注损伤相关靶点的内在联系, 从代谢组学角度阐释中药抗溶栓状态下脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

成年雄性SD大鼠176, SPF级, 体重250~300g。由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(粤)2003-0001。

基金项目: 中国博士后基金(200601390732); 广东省科技计划项目(2006B35603007)

通讯作者: 付于, happyfu1970@163.com, (022) 27432154

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 药物

芎芪合剂剂量依生药比例换算,由黄芪总皂苷1.0g、芍药总苷0.90g、磷酸川芎嗪0.10g溶制10ml浓缩药液,相当于生药黄芪50g、赤芍30g、川芎10g,由广东省中医院制剂室提供。精密量取7.12ml浓缩液加生理盐水稀释至500ml,药物浓度为2.85mg/ml,置4℃冰箱保存备用。注射用尿激酶:25万IU/瓶,丽珠集团丽珠制药厂,批号:051001。

1.3 试剂与仪器

氨基酸对照品、衍生试剂OPA、FMOC, Sigma公司生产。重水(D₂O)、三甲基硅烷基丙酸(TSP)加拿大默克公司生产。高效液相色谱仪HP1050型,美国惠普公司生产。Unity Inova 600型超导傅立叶变换核磁共振(NMR)波谱仪为美国Varian公司产品。

1.4 动物模型制备

参照Longa^[3]方法,以改良线栓法制成大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)模型。参照Longa 5分制评分标准,待大鼠麻醉清醒后进行神经学评分。评分1~3分为造模成功。造模成功率在85%,造模成功后分组。

1.5 动物分组及给药

采用PEMS3.1统计软件包,进行完全随机设计(单因素实验设计),分成5组,每组30只,每项实验每组10只:假手术组、模型组、尿激酶治疗组(尿激酶组)、芎芪合剂治疗组(芎芪合剂组)、尿激酶加芎芪合剂治疗组(尿激酶加芎芪合剂组)。

芎芪合剂组、尿激酶加芎芪合剂组造模前7天腹腔注射芎芪合剂稀释液2ml/200g,每日1次;假手术组、模型组、尿激酶组造模前7天腹腔注射生理盐水2ml/200g,每日1次。栓塞后1.5h,假手术组、模型组腹腔注射生理盐水2ml/200g;尿激酶组腹腔注射尿激酶2ml/200g(2×10⁴ IU/kg);芎芪合剂组腹腔注射芎芪合剂稀释液2ml/200g,为临床用量10倍(以临床用量200mg/70kg计);尿激酶加芎芪合剂组腹腔注射2ml/200g(尿激酶2×10⁴ IU/kg溶解在芎芪合剂稀释液中)。栓塞后2h拔出线栓形成再灌注。

1.6 氨基酸检测

在缺血2h再灌注24h评分后,完整剥取脑组织,用冷生理盐水将表面的血液冲洗干净,去除嗅球、小脑和低位脑干,取右侧(缺血侧)脑组织,准确称取100mg置匀浆器中,加适量90%乙醇进行匀浆。采用高效液相色谱仪检测谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp),结果以mg/g(湿脑)表示。

1.7 统计学方法

用SPSS 13.0统计软件处理数据,计量资料用均数

±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

1.8 血浆代谢组学分析

缺血2h再灌注24h评分结束处死动物,断头取血,EDTA-K₂抗凝,离心后收集血浆,1ml加入乙腈后,剧烈摇动30s,静置5min,4℃ 13000r/min离心3min,吹去乙腈,-20℃冷冻干燥备用。用适量的D₂O溶解冻干粉,添加TSP后,NMR核磁共振仪测量。

在超导傅立叶变换NMR仪上调用NOE相关2D-NMR谱(nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY)脉冲序列,采用预饱和方式抑制水峰,饱和时间为2s,混合时间0.15s,谱宽7000Hz,采样点数64k,叠加次数128次,饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过32k傅立叶变换转为NMR谱图。以TSP为化学位移参考峰的位置,设为0。调用VNMR中的程序将¹H谱按默认值,从9.5ppm到0.5ppm,每段为0.04ppm,把芎芪合剂及其代谢产物所在的峰谱位移和水峰、脲素类活性氢所在的位移去除进行分段并计积分。

将上述得到的数据文件利用SIMCA-P10.0+统计软件(网络版本号: CWEP-9735-3498Simca-P: CTHK-1521-2943,下载地址: www.umetrics.com)进行主成分分析(principal components analysis, PCA)^[4]。PCA分析前先对数据进行平均中心化处理和Pareto标度(Pareto scaling)处理。分析结果以得分图及载荷图(loading splot)的形式显示,分别表示样本间由代谢差异导致的分布以及代谢物的分布。

2 结果

2.1 芎芪合剂对脑缺血大鼠脑组织氨基酸含量影响

附表 各组大鼠缺血2h再灌注24h氨基酸含量的比较(mg/g湿脑, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Asp	Glu
假手术组	10	0.344±0.032	1.278±0.081
模型组	10	0.531±0.043*	1.660±0.078*
尿激酶组	10	0.487±0.036*	1.571±0.117*
芎芪合剂组	10	0.358±0.042△○	1.309±0.096△○
尿激酶加芎芪合剂组	10	0.371±0.034△○	1.387±0.038○

注:与假手术组比较,*P<0.05;与模型组比较,○P<0.05;与尿激酶组比较,△P<0.05

附表表示,与模型组、尿激酶组比较,芎芪合剂组大鼠缺血侧脑组织Glu、Asp含量显著降低(P<0.05);芎芪合剂组与假手术组比较差异无统计学意义(P>0.05);尿激酶组Glu、Asp含量明显高于假手术组(P<0.05),但与模型组比较无统计学差异(P>0.05);尿激酶加芎芪合剂组Glu、Asp含量低于模型

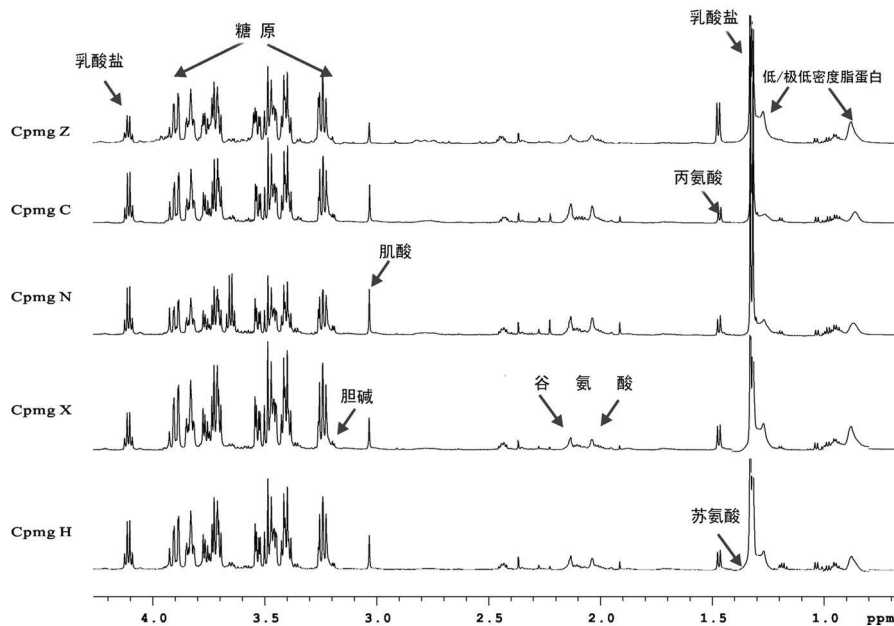


图1 各组动物血浆典型代谢指纹模拟图谱(Cpmg¹)
(c-模型组 z-假手术组 n-尿激酶组 x-芎芪合剂组 h-尿激酶加芎芪合剂组)

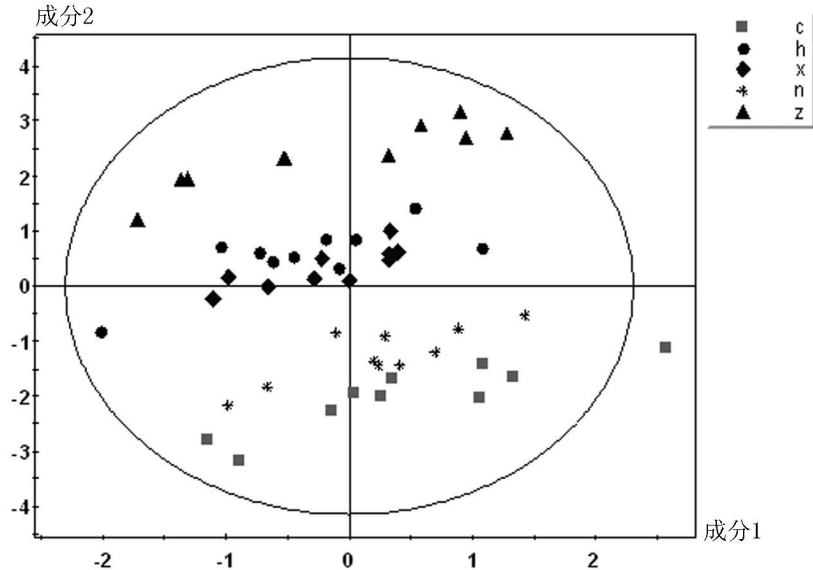


图2 各组动物血浆代谢指纹得分图谱(Led)

注:c-模型组 z-假手术组 n-尿激酶组 x-芎芪合剂组 h-尿激酶加芎芪合剂组,主成分积分值集中分布于椭圆形散点图(95%置信区内)的4个区域,假手术组代谢成分集中在得分图的上部,芎芪合剂组和尿激酶加芎芪合剂组集中在中部,模型组和尿激酶组集中在下部

组($P < 0.05$),但 Asp 含量却高于尿激酶组($P < 0.05$)。说明芎芪合剂能降低大鼠缺血侧脑组织 Glu、Asp 含量,并趋于正常,而尿激酶无抑制 Glu、Asp 含量增高的作用,但尿激酶加用中药芎芪合剂能抑制 Glu、Asp 含量增高。

2.2 各组血浆 NMR 代谢指纹图谱的宏观观察及 PCA

图1示,模型组与假手术组比较血浆代谢图谱明显发生变化;尿激酶组血浆代谢图谱与模型组相似;芎芪合剂组与模型组及尿激酶组比较血浆代谢图谱明显发

生变化,与假手术组相似;尿激酶加芎芪合剂组与芎芪合剂组血浆代谢图谱相似。

图2示,PCA 结果显示,各组间代谢产物主要围绕着10种化合物发生变化:低密度脂蛋白 LDL(CH_3) (0.87ppm,贡献率8%),极低密度脂蛋白 VLDL(CH_2)和 VLDL(CH_3) (1.31ppm,贡献率47.5%),糖原 glycogen (3~4ppm,贡献率18%),苏氨酸 threonine (1.36ppm,贡献率10%),丙氨酸 alanine (1.48ppm,贡献率37%),乳酸盐 lactate (1.32, 4.12ppm,贡献率25%,26%),肌酸 creatine (3.04ppm,贡献率17%),胆

碱 choline(3.2ppm, 贡献率12%), 谷氨酸 glutamate (2.15ppm, 贡献率26%)。芎芪合剂能抑制 MCAO 大鼠缺血再灌注引起的血浆谷氨酸以及乳酸、肌酸、胆碱代谢水平的升高和苏氨酸、丙氨酸以及血糖代谢水平的减低,说明芎芪合剂能部分逆转再灌注损伤引起代谢产物的变化,尤其是兴奋性氨基酸和乳酸含量的逆转。

3 讨论

芎芪合剂由益气活血中药黄芪、赤芍、川芎的有效成分黄芪总苷、赤芍总苷、川芎嗪组成,研究表明,黄芪总苷^[5,6]、赤芍总苷^[7]、川芎嗪^[8]在现代药理研究都具有抑制血小板聚集,降低血黏稠度及凝固性,扩张脑血管,改善微循环,抑制动脉血栓形成以及抗氧化损伤的作用。

成功的疾病治疗必须使代谢网络中的缺陷部分正常化,同时又不得干扰其他维持健康所必须的代谢途径的调控^[9]。本实验结果显示,模型组缺血2h 再灌注24h 后血浆代谢图谱与假手术组明显发生了病理变化、代谢网络出现了异常;尿激酶组血浆代谢图谱与模型组相似,说明尿激酶对缺血2h 再灌注24h 后血浆代谢图谱的病理变化、代谢网络的异常无改善作用;而芎芪合剂组与模型组比较血浆代谢图谱明显发生变化,且与假手术组相似,说明芎芪合剂能使代谢平衡由疾病状态恢复到接近正常状态,使代谢网络中的缺陷部分趋向正常。因为代谢物图谱是反映生命过程终点代谢物成分的组成,所以这一结果从整体上说明了芎芪合剂抗脑缺血再灌注损伤的有效性。

缺血、缺氧、创伤、中毒等因素能触发中枢神经系统的 EAA 过度兴奋,在能量代谢失衡的基础上,异常堆积,产生神经毒性作用。急性脑缺血再灌注损伤后脑内 EAA 的浓度变化与脑损伤的程度有关^[10,11]。EAA 包括 Glu、Asp 等。其中 Glu 是中枢神经系统内含量最高的一种氨基酸。本研究显示,芎芪合剂能够抑制缺血侧脑组织兴奋性氨基酸 Glu、Asp 的增高,并使之趋向于正常。模型组脑缺血再灌注后,机体出现应激反应,代谢严重紊乱,表现为乳酸、肌酸、胆碱以及兴奋性氨基酸谷氨酸较假手术组明显升高,血脂、血糖以及苏氨酸、丙氨酸明显减低。而尿激酶则没有芎芪合剂的拮抗作用,谷氨酸和乳酸的含量仍然较高,与模型组的代谢产物区别甚微。芎芪合剂组苏氨酸、丙氨酸、血糖、极低密度脂蛋白代谢组水平升高,乳酸盐、肌酸、胆碱以及兴奋性氨基酸谷氨酸代谢组水平降低。其中乳酸是葡萄糖无氧代谢的最终产物,乳酸升高,与组织缺氧、缺血低灌注及转化乳酸代谢障碍有关缺血再灌注时,组

织严重的缺氧和应激反应,乳酸含量升高。这说明芎芪合剂能部分逆转再灌注损伤引起代谢产物的变化,尤其是兴奋性氨基酸和乳酸含量的逆转,与上述缺血侧脑组织兴奋性氨基酸 Glu、Asp 含量的变化趋势相一致。

综上所述,芎芪合剂能够调节 MCAO 大鼠缺血再灌注后的代谢平衡,使代谢网络中的缺陷部分趋向正常。本研究所采用的代谢组学方法虽然能在一定程度上反映机体整体变化规律,但是要做到进一步系统和深入,还有待于深入研究。

参考文献

[1]Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics [J]. Nature, 2008, 455 (7216) :1054-1056.
[2]Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC. The Handbook of Metabonomics and Metabolomics [M]. Elsevier, 2007;1-33.
[3]Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20(1) :84-91.
[4]Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR [J]. Trend Anal Chem, 2008, 27(3) :228-237.
[5]郭政,魏玉苗,刘淑霞. 黄芪在脑血管疾病中的应用研究进展[J]. 山西中医,2007,23(1) :72-74.
[6]石海莲,吴大正,胡之璧. 黄芪皂苷甲的研究进展[J]. 中国药学杂志,2008,43(8) :565-567.
[7]纳鑫,汪雪兰,皮荣标. 川芎嗪对中枢神经系统的药理作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(1) :77-80.
[8]阮金兰,赵钟祥,曾庆忠,等. 赤芍化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报,2003,9(9) :965-970.
[9]Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, et al. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition [J]. NMR Biomed, 2005, 18(3) :143-162.
[10]Takeuchi H, Jin S, Suzuki H, et al. Blockade of microglial glutamate release protects against ischemic brain injury [J]. Exp Neurol, 2008, 214(8) :144-146.
[11]Kimmelberg HK, Nestor NB, Feustel PJ. Inhibition of release of taurine and excitatory amino acids in ischemia and neuroprotection [J]. Neurochem Res, 2004, 29(1) :267-274.

(收稿日期:2008-09-12;修回日期:2009-04-25)

[编辑:行 之]

更正:本刊2009年第7期第669页“来函摘登”作者陈业兴的地址应为“海南省”,第8期第754页“短篇报道”左栏倒数第9行川芎嗪剂量应为40mg。特此更正,并向作者和读者致歉。

本刊编辑部