

血府逐瘀汤促进大鼠脑损伤修复机理的代谢组学研究

刘建仁, 黎启明, 易铭佳, 黄良文

广州中医药大学第一附属医院颅脑科, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 采用氢谱核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 技术测定大鼠脑挫裂伤后血浆代谢物变化及中药血府逐瘀汤治疗后相关代谢物变化, 从代谢组学探讨血府逐瘀汤促进脑损伤修复的作用机理。方法: 以 $^1\text{H-NMR}$ 技术结合模式识别和主成分分析法 (PCA), 分析大鼠脑挫裂伤模型组、中药组和假手术组术后第 1、3、5、7 天血浆的核磁共振氢谱以及相应代谢物谱群的变化。结果: $^1\text{H-NMR}$ 测得中药组、模型组与假手术组 3 组大鼠血浆代谢谱存在明显差异 ($P < 0.05$), 通过主成分分析法 (PCA) 能清晰地将模型组与假手术组、中药组区分开来。模型组与假手术组比较发现, 模型组血浆中 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、肌酸 (Cre)、牛磺酸 (Tau) 等含量下降, 乳酸 (Lac)、谷氨酸 (Glu)、胆碱 (Cho) 等代谢物的浓度上升; 中药组治疗后血浆中 Lac、Glu、Cho 等代谢物的浓度较模型组降低, 而 NAA、GABA、Cre 等含量升高。结论: 大鼠脑挫裂伤损伤机制可能包括脑组织缺血缺氧能量代谢紊乱 (Cre 下降、Lac 升高)、神经细胞损伤导致的神经元功能受损 (NAA 下降) 和细胞膜损伤 (Cho 升高)、神经兴奋毒性损伤 (Glu 升高、GABA 下降); 血府逐瘀汤在脑损伤早期干预治疗, 能改善脑挫裂伤后缺血缺氧状态, 减轻继发性脑损伤, 促进脑损伤修复, 改善预后。

[关键词] 脑挫裂伤; 血浆代谢组学; 氢谱核磁共振; 血府逐瘀汤

[中图分类号] R651.1*5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 05-0206-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.05.079

重型颅脑损伤因其致残率和死亡率居高不下, 一直是神经外科研究的难点和热点。由于其损伤机制目前仍然有许多不明确的地方, 加之疗效确切的治疗手段和药物缺乏, 严重影响了临床救治水平。本研究基于以上原因, 拟应用代谢组学^[1-2]研究方法, 通过对大鼠脑损伤模型组和中药治疗组血浆样品的氢谱核磁共振($^1\text{H-NMR}$)检测, 结合统计学方法分析, 寻找脑挫裂伤早期病理变化的特异生物标记物, 分析中药促进脑损伤修复的作用机理及可能作用途径。

1 材料与方

1.1 材料 Bruker Avance-500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), 重水(D_2O)、氘代 3-三甲基甲硅烷基丙酸钠盐(TSP)均购自 Sigma-Aldrich 公司, 水为自制纯净水, 固体 NaHPO_4 和 Na_2HPO_4 购于 Sigma-Aldrich 公司。SD 大鼠, 均为雌性, 体重(200 ± 20)g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(粤)2008-0020。中药购自广州中医药大学第一附属医院中药药房, 根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》, 按大鼠的剂量 = $6.3 \times$ 人的临床剂量 / 人的体重 \times 大鼠体重, 即每剂中药中含有当归、红花、柴胡、牛膝、生地黄各 0.315 g, 桃仁 0.42 g, 枳壳、赤芍、甘草、桔梗、川芎各 0.21 g。大鼠术后 6 h 开始予中药汤剂灌胃, 每天 1 剂, 处死

当天不服用中药, 中药组 32 只大鼠, 总共 128 剂, 一次煎煮, 经计量计算公式, 共煎煮成 256 mL 汤剂, 每只大鼠每次灌胃 2 mL, 每 6 mL 制成 1 个真空包装, 存放 4℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 脑挫裂伤模型及分组 大鼠造模前均禁食 8 h, 禁水 10 h, 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后, 俯卧固定于木板上。右侧颅顶部备皮, 常规消毒铺巾, 选取右侧颅顶旁正中切口, 暴露前囟、冠状缝、矢状缝及双侧顶骨, 于右侧顶部前囟后 2 mm, 中线旁开 2 mm, 向后外方钻孔, 作一直径约为 4 mm 的骨窗, 保持硬膜完整, 置入打击垫片。采用改良 Feeney 架自由落体撞击法^[3]。模型组(32 只大鼠)、中药组(32 只大鼠)均用 20 g 砝码从 20 cm 高处垂直落下撞击大鼠, 使其致伤, 造成脑挫裂伤模型。假手术组(32 只大鼠)作对照, 作骨窗后直接缝合头皮, 不予撞击。中药组在打击后 6 h 开始给予血府逐瘀汤灌胃, 每天 1 剂。假手术组、模型组予等量生理盐水灌胃^[4]。

1.2.2 大鼠神经功能缺损评分 参照文献^[5]对大鼠进行神经功能缺损评分, 其评分标准参照《现代药理实验方法学》评分方法, 采用 14 分制, 单盲法进行评分。造模后 6 h 评分 ≥ 7 分则表明模型成功, < 7 分从本实验中剔除。

[收稿日期] 2013-12-12

[基金项目] 广东省社会发展领域科技计划项目立项资助项目 (编号: 粤科社字 [2011] 106 号)

[作者简介] 刘建仁 (1972-), 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合防治颅脑损伤疾病。

1.2.3 大鼠血样采集 假手术组、模型组和中药组分别于术后第1天、第3天、第5天、第7天(各组每次随机抽取8只大鼠),10%多聚甲醛腹腔内注射麻醉后,开腹,经腹主动脉采血4 mL^[6],离心机在4℃下4 000 r/min离心10 min。离心后取上清血浆1.5 mL转移至2 mL抗凝EP管中,-80℃冰箱保存备用。

1.2.4 大鼠脑挫裂伤部位病理切片 将大鼠在麻醉下采血后常规灌注固定,开颅取脑,以损伤灶为中心(假手术组在相近似位置),沿冠状位切成前后两部分,浸于4%多聚甲醛中固定24 h以上,经乙醇梯度脱水,二甲苯透明1 h,62℃浸蜡3 h后石蜡包埋,切片(片厚5 μm),常规HE染色,制成大鼠脑挫裂伤部位病理切片^[7]。

1.2.5 血浆代谢组样品预处理 实验时将所有血浆样本常温解冻,每管取300 μL上层血浆加至5 mm NMR测试管中,后加入0.2 mol/L磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.2 mol/L NaH₂PO₄,pH=7.4)200 μL和重水50 μL,振荡混匀^[8]。

1.2.6 NMR检测 NMR实验采用BRUKER Avance 500 MHz超导核磁共振波谱仪,实验温度为298K。采用Cart-Purcell-Meiboom-Gill [CPMG, relaxation delay-90-(π-180-π)n-acquisition]脉冲序列,回波时间2nT=100 ms,4 s延迟时间,10 kHz谱宽,64 k数据点,采集次数为64次。化学位移以乳酸甲基双重峰δ 1.33进行定标。

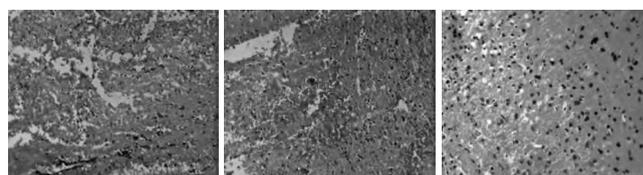
1.2.7 ¹H-NMR谱的数据预处理和主成分分析 对所有¹H CPMG谱进行自动积分(TOPSPIN 2.0软件),积分区间δ 0.5~9.0,积分间隔Δδ=0.02,进行手动调相和基线校正。为消除压水后残余峰值的影响,δ 4.6~5.2的积分值设为0。此外,为了消除样本间因浓度不同而带来的分析误差,在进行主成分分析之前对各分段积分值进行归一化处理。归一化后的数值将作为原始数据导入软件SIMCA-P 10.0(Umetrics, Sweden)中进行模式识别主成分分析(principal component analysis, PCA)^[9]。

1.3 统计学方法 从上述归一化后的100段积分值中选取出现7种代谢物[血浆中N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、γ-氨基丁酸(GABA)、肌酸(Cre)、谷氨酸(Glu)、胆碱(Cho)、牛磺酸(Tau)、乳酸(Lac)]峰值的不同区间段,将每一种代谢物的不同区间段的积分值相加得到7个总积分值,在统计分析中就用这7个总积分值来分别表示7种代谢物的含量大小,然后用单向方差分析方法(One-way ANOVA.SPSS 13.0软件)对它们进行分析。

2 结果

2.1 组织病理学结果 肉眼观察模型组脑组织发现脑损伤灶坏死空洞,可见局部水肿、组织增生;假手术组脑组织表面光滑,沟回整齐、清晰,无充血、肿胀及血肿等。HE染色后镜下观察模型组损伤灶,神经元细胞周围出现较多空隙,脑皮质分层不清,血管轻度水肿,炎性细胞浸润,胶质细胞增生,部

分可见血肿灶;部分神经元胞质强烈嗜伊红,核固缩,胞核与胞浆黏附在一起;部分神经元细胞肿胀,体积增大,核膜不清,明显水肿;远离损伤灶的皮质未发生显著变化;中药组术后第1天损伤组织的血细胞、炎性细胞渗出较模型组少,血管水肿、神经元水肿也较模型组轻;假手术组脑组织完整,组织结构正常,细胞排列有序,染色均匀,无出血、水肿及明显损伤,未见炎性细胞浸润及血管扩张现象。



模型组

中药组

假手术组

模型组:术后第1天撞击部位脑组织病理切片:脑组织水肿周围结构疏松,水肿明显,炎细胞增多,有大量红细胞渗入(HE×100)。中药组:术后第1天损伤组织血细胞、炎性细胞渗出较模型组少,血管水肿、神经元水肿也较模型组轻(HE×100)。假手术组:术后第1天相应部位脑组织病理切片:脑组织完整,组织结构正常,细胞排列有序,染色均匀,无出血、水肿及明显损伤(HE×100)。

2.2 NMR分析

2.2.1 各组大鼠核磁共振波谱分析 模型组、中药组和假手术组核磁共振波谱分别见图1、图2、图3。其相关的代谢物图1显示,大鼠脑外伤后其波谱中很多种代谢物发生了显著的变化,如Cre、GABA、NAA等峰出现了显著下降,特别是与神经元相关的NAA的下降尤为突出,提示有部分神经元功能受到损伤;而与脑缺血缺氧程度紧密相关的代谢物Cho、Glu、Lac的含量增加。中药组大鼠服用血府逐瘀汤汤剂后NAA等峰值降低幅度相对模型组小,提示早期使用血府逐瘀汤治疗能减轻大鼠脑挫裂伤后神经元损伤;中药组大鼠术后第1天血浆Glu增高幅度较模型组小,提示该中药汤剂能减轻脑挫裂伤早期神经兴奋毒性损伤。

2.2.2 各组大鼠波谱的主成分分析 将所有核磁共振波谱进行主成分分析。图4是大鼠波谱中第一和第二主成分的Score图,图中每一个点分别代表一个测试样品,Score图中模型组、中药组、假手术组能很好区分开来,说明造模成功。图5是与PCA对应的第一、二主成分的Loading图,图中PC1、PC2对应的值,1.21、2.03、2.27、3.03、3.21、3.25、4.11等化学位移对应化学成分对实验结果贡献值最大。

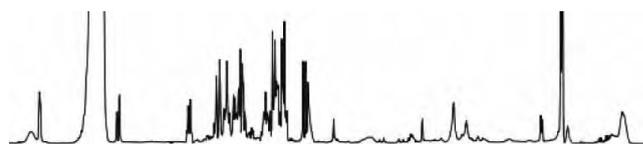


图1 模型组

创造条件；后期能加快神经细胞损伤的再修复，促进神经组织功能康复。

[参考文献]

- [1] Water J, Nicolson JK, Garrod S, et al. High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and bio-chemical stability of tissue during spectral acquisition[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 282(1): 16.
- [2] XU Guo-wang, LU Xin, YANG Sheng-li. Recent advances in metabonomics[J]. *Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(6): 701.
- [3] 张荣军, 游潮, 蔡博文, 等. Feeney法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12): 1015-1018.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1241.
- [5] 程发峰, 宋文婷, 郭少英, 等. 神经功能损伤评分在大鼠脑缺血实验中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(3): 43-47.
- [6] 车兆义, 邹悦, 宋清斌, 等. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨[J]. *局解手术学杂志*, 2008, 17(2): 84-85.
- [7] 陈应柱, 许俊, 袁成林. 大鼠缺血脑组织芯片的构建[J]. *中国脑血管病杂志*, 2006, 3(11): 504-507.
- [8] 杨永霞, 杨生义, 梁敏锋, 等. 乙肝后肝硬化患者血清代谢组的核磁共振氢谱研究[J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(1): 99-101.
- [9] 杨永霞, 梁敏锋, 陈阿丽, 等. 主成分分析方法在食管癌患者血清代谢物研究中的应用[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(23): 97-98.
- [10] 李艳丽, 王洪彬, 郭灿雄, 等. 利用基于¹H NMR的代谢组学分析研究重离子辐射对大鼠额叶皮质区的影响[J]. *波谱学杂志*, 2010, 21(6): 103-112.

(责任编辑: 马力)

地黄炮制过程中毛蕊花糖苷变化的研究

尚伟庆¹, 贺清辉², 张建军²

1. 缙云县中医院, 浙江 缙云 321400; 2. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244

[摘要] 目的: 采用 RP-HPLC 法研究地黄中毛蕊花糖苷随炮制时间动态变化的情况, 建立生地黄和熟地黄中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量测定方法。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱, 柱温 30℃; 流动相为甲醇 (A) -0.1%甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 min, 30%A; 30 min, 40%A; 45 min, 45%A; 60 min, 55%A), 流速 1 mL/min; 检测波长 330 nm。比较生地黄不同炮制时间 (0 h, 8 h, 16 h, 32 h) 的特征图谱, 测定地黄饮片中的毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量。结果: 毛蕊花糖苷含量随炮制时间的增加而降低, 异毛蕊花糖苷含量随炮制时间增加而增加。生地黄中毛蕊花糖苷平均含量高于熟地黄, 异毛蕊花糖苷平均含量低于熟地黄。结论: 生地黄中毛蕊花糖苷在炮制过程中可能部分转化为异毛蕊花糖苷, 将熟地黄中的异毛蕊花糖苷和毛蕊花糖苷共同作为评价熟地黄质量的指标更加合理。

[关键词] 生地黄; 熟地黄; 炮制; 毛蕊花糖苷

[中图分类号] R283; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 05-0209-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.05.080

地黄为玄参科植物地黄 *Renmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根, 具有清热凉血、养阴生津的功效, 地黄中的主要化学

成分是以梓醇为代表的环烯醚萜及其苷类成分、以毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类及糖类成分。《中国药典》^[1]2010年版

[收稿日期] 2013-10-21

[基金项目] 广东省教育厅中药配方颗粒产业化产学研科技平台项目 (编号: 2011A091000005)

[作者简介] 尚伟庆 (1972-), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药药材质量评价。

[通讯作者] 贺清辉, E-mail: qiyuping2008@163.com。