

关白附与禹白附对中风沙鼠影响差异的尿液代谢组学分析

周丽婷, 曾琬婷, 贾茹, 徐慧颖, 丁奕辉, 董昊, 马浩文, 曲扬, 才谦*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:采用非靶向代谢组学技术探究关白附与禹白附对中风沙鼠尿液代谢产物的影响差异,进而明确二者作用机制及其异同。方法:将24只沙鼠随机分成空白组、模型组、关白附组、禹白附组。除空白组外,其余各组均采用右侧单侧结扎沙鼠颈动脉构建缺血性脑卒中模型。各给药组分别灌胃对应的药材全粉混悬液($0.586\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),共给药14 d。给药第0、3、7、14天,采用Longa评分法对各组沙鼠进行神经功能缺损评分。给药结束后收集各组沙鼠血清、脑组织及尿液,采用2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色法检测脑梗死率,利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对血清和脑组织中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)的水平进行检测。采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)对各组沙鼠进行尿液代谢组学分析,并采用多元统计分析对数据进行处理,以第一主成分的变量重要性投影(VIP)值 >1 且 t 检验 $P<0.05$ 筛选差异代谢物。运用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库结合MetaboAnalyst 5.0软件对筛选出的差异代谢物进行代谢通路分析。结果:与空白组比较,模型组神经功能缺损评分明显升高($P<0.05$),与模型组比较,关白附和禹白附组在给药7 d和14 d后神经功能缺损评分明显降低($P<0.05$);与空白组比较,模型组脑梗死率明显升高($P<0.05$),与模型组比较,关白附和禹白附组脑梗死率明显降低($P<0.05$);与空白组比较,模型组沙鼠血清和脑组织中IL-6、TNF- α 、MDA水平明显升高($P<0.05$),SOD、GSH、NO水平明显降低($P<0.05$),与模型组比较,关白附和禹白附组均能不同程度下调IL-6、TNF- α 、MDA水平并上调SOD、GSH、NO水平。尿液代谢组学共筛选出112个内源性差异代谢物,其中关白附和禹白附分别回调了其中16个和26个代谢物,可分别作为二者治疗中风沙鼠的潜在生物标志物。通路分析结果显示,关白附和禹白附均对精氨酸和脯氨酸代谢、嘧啶代谢、氨酰基-tRNA生物合成具有调节作用,而关白附还可调节核黄素代谢,禹白附还可调节嘌呤代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,花生四烯酸代谢,泛酸盐和辅酶A的生物合成及 β -丙氨酸代谢。结论:关白附和禹白附均具有较好治疗中风的作用,其中关白附作用更强。关白附主要调节氨基酸代谢、氧化应激等,而禹白附主要涉及氨基酸代谢、脂质代谢和能量代谢等。

[关键词] 关白附;禹白附;代谢组学;缺血性脑卒中;多元统计分析;生物标志物;超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)08-0157-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231267 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230807.1144.002>

[网络出版日期] 2023-08-07 17:22:57

Urinary Metabolomics Analysis of Differences in Effect of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on Gerbils with Stroke

ZHOU Liting, ZENG Wanting, JIA Ru, XU Huiying, DING Yihui, DONG Hao,
MA Haowen, QU Yang, CAI Qian*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on the urinary metabolites of gerbils with stroke by non-targeted metabolomics technique, and then to clarify the mechanism of the two, as well as their similarities and differences. **Method:** Twenty-four gerbils were randomly

[收稿日期] 2023-05-18

[基金项目] “兴辽英才”计划科技创新领军人才(特聘教授)项目(XLYC2002004)

[第一作者] 周丽婷,在读硕士,从事中药化学相关研究,E-mail:2747610681@qq.com

[通信作者] *才谦,博士,教授,博士生导师,从事中药化学相关研究,E-mail:caiqianmail@sina.com

divided into control group(CG), model group(MG), Aconiti Coreani Radix group(RA) and Typhonii Rhizoma group(RT). Except for the CG, ischemic stroke model was constructed using right unilateral ligation of gerbil carotid artery in the remaining groups. Except for the CG and MG, rats in the other groups received whole powder suspension($0.586\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) was administered for 14 days. The neurological deficit in each group was scored by Longa scoring on days 0, 3, 7 and 14. After the end of administration, the serum, brain tissue and urine of gerbils in each group were collected, and the rate of cerebral infarction was detected by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC), and the levels of interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD), glutathione(GSH), and nitric oxide(NO) in serum and brain tissue were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The urine metabolomics of gerbils in each group was studied by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry(UPLC-Q-Orbitrap-MS), and the data were processed by multivariate statistical analysis, and differential metabolites were screened based on value of variable importance in the projection(VIP) of the first principal component >1 and t -test $P<0.05$. Metabolic pathway analysis of the screened differential metabolites was performed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) database and Metaboanalyst 5.0. **Result:** Compared with the CG, the neurological deficit score was significantly increased in the MG($P<0.05$), compared with the MG, the neurological deficit scores in the RA and RT were significantly reduced after 7 d and 14 d($P<0.05$). Compared with the CG, the rate of cerebral infarction was significantly increased in the MG($P<0.05$), compared with the MG, the rates of cerebral infarction in the RA and RT were significantly reduced($P<0.05$). Compared with the CG, the levels of IL-6, TNF- α , and MDA in the serum and brain tissue of gerbils from the MG were significantly increased($P<0.05$), and the levels of SOD, GSH and NO were significantly reduced($P<0.05$). Compared with the MG, Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma could down-regulate the levels of IL-6, TNF- α and MDA, and up-regulated the levels of SOD, GSH and NO. A total of 112 endogenous differential metabolites were screened by urine metabolomics, of which 16 and 26 metabolites were called back by Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma, and could be used as potential biomarkers for both treatments in stroke gerbils, respectively. The results of the pathway analysis showed that both Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma had regulatory effects on arginine and proline metabolism, pyrimidine metabolism, and aminoacyl-tRNA biosynthesis. In addition, Aconiti Coreani Radix could also regulate riboflavin metabolism, Typhonii Rhizoma could also regulate purine metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, arachidonic acid metabolism, biosynthesis of pantothenate and coenzyme A, and β -alanine metabolism. **Conclusion:** Both Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma have better therapeutic effects on stroke, with Aconiti Coreani Radix having stronger effects. From the metabolomics results, the main metabolic pathways regulated by Aconiti Coreani Radix involve amino acid metabolism, oxidative stress and so on, while Typhonii Rhizoma mainly involve amino acid metabolism, lipid metabolism, energy metabolism, etc.

[Keywords] Aconiti Coreani Radix; Typhonii Rhizoma; metabolomics; ischemic stroke; multivariate statistical analysis; biomarkers; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry(UPLC-Q-Orbitrap-MS)

缺血性脑卒中是由于脑组织短暂或持续性的缺血、低氧而导致脑功能发生障碍的一种大脑不可逆性损伤,此种脑损伤是一个极其复杂的病理过程,其中涉及多因素、多通路、多环节^[1]。在脑缺血过程会产生一系列的生物化学反应,会出现氨基酸、脂肪、水和电解质等代谢紊乱。代谢组学通过

代谢谱分析,对缺血性脑卒中的生物样品进行识别、鉴定,从而获得内源性代谢产物的信息,进而找到可以反应缺血性脑卒中的生理病理反应和发展进程的生物标记物。目前,运用代谢组学方法研究缺血性脑卒中十分广泛。其中尿液代谢组学研究发现,缺血性脑卒中主要涉及的代谢通路有嘌呤

代谢、花生四烯酸代谢、嘧啶代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、色氨酸代谢等^[2]。在粪便代谢组学研究中。与缺血性脑卒中相关的代谢通路主要有花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、胆汁酸生物合成、鞘脂代谢^[3]；血液代谢组学研究表明，与缺血性脑卒中相关的通路有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，鞘糖脂代谢，三羧酸循环(TCA)，精氨酸与脯氨酸代谢等^[4]。由此可知缺血性脑卒中引发的代谢紊乱可通过尿液、血液、粪便中内源性代谢物的变化得以体现。因此，通过观察内源性代谢物的改变，为缺血性脑卒中的作用机制及其治疗药物作用机制的研究提供了新的方向。

关白附为毛茛科植物黄花乌头 *Aconitum coreanum* 的干燥块根，具有祛风痰、定惊痫、散寒止痛的作用。禹白附为天南星科植物独角莲 *Typhonium giganteum* 的干燥块茎，具有祛风痰、定惊搐、解毒散结、止痛等功效^[5]。自1985年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)起，只收录白附子(禹白附)，关白附不再收录。虽其之后未被《中国药典》收录，但其功效极具研究价值，经考证发现两者均具有治疗中风的作用，但目前药效及作用机制尚不明确，临床应用较少，因此探讨关白附和禹白附治疗中风的药效和作用机制可为预防和治疗中风提供新的方向。

代谢组学对于研究疾病发病机理和药物总体作用机制具有一定优势，被广泛应用于探讨药物的作用机制研究^[6]。近年来，愈来愈多的研究人员应用代谢组学的研究方法，采用血液、组织、尿液及粪便等生物样本对缺血性脑卒中的发病机制及作用靶点进行研究^[7]。由于尿液可快速反应机体状态，同时对机体的正常生理活动也至关重要的，进而成为应用最广泛的生物样本，被广泛应用于非靶向代谢组学研究^[8]。因此本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)，基于非靶向代谢组学探讨关白附与禹白附对中风沙鼠尿液中的差异代谢物和代谢通路的影响，从代谢组学角度进一步阐明关白附与禹白附干预治疗缺血性脑卒中的机制，从而为关白附和禹白附在临床上的合理应用提供依据。

1 材料

Vanquish型超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120型高分辨质谱、Heraeus Fresco 17型离心机(美国赛默飞世尔公司)，BSA124S-CW型万分之一分析天平(德国赛多利斯公司)，PS-60AL型超

声仪(深圳市雷德邦电子有限公司)，EPOCH型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海联硕生物科技有限公司，批号均为202206)。2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)染色液(北京索莱宝科技有限公司，批号20210628)，4%多聚甲醛(上海尚宝生物科技有限公司，批号202112)，三氯乙醛水合物(上海麦克林生化科技有限公司，批号C12659264)，屈臣氏蒸馏水，甲醇、乙腈、乙酸铵及氨水均为质谱级，其余试剂均为分析级。关白附 *A. coreanum* 购于辽宁西丰，禹白附 *T. giganteum* 购于安徽亳州，以上药材均为当地农户栽培，经辽宁中医药大学药用植物教研室许亮教授鉴定为正品。

清洁级健康雄性蒙古沙鼠24只，4~5月龄，体重50~70 g，由哈尔滨医科大学动物学部提供，合格证号SCXK(黑)2013-001。本研究方案通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审核，批准编号2019YSDW-028-01。

2 方法

2.1 药物混悬液的配制 根据2020年版《中国药典》记载及临床应用，关白附和禹白附每日成人剂量为3~6 g^[9]，以4.5 g作为成人每日剂量进行人与动物临床剂量折算，沙鼠的每日临床等效剂量为0.586 mg·g⁻¹。将关白附和禹白附分别粉碎后过60目筛，加蒸馏水现用现配制成0.586 mg·g⁻¹的混悬液，即得。

2.2 分组、造模与给药 24只沙鼠适应性喂养1周后，随机分成空白组、模型组、关白附组、禹白附组，每组6只。除空白组沙鼠外，其余各组沙鼠均采用右侧单侧结扎颈动脉造成缺血性脑卒中模型。沙鼠造模后，出现右眼睁不开，头部向右侧倾斜，不能正常直立等表现，表明造模成功。给药组分别灌胃关白附和禹白附药材全粉混悬液(0.586 mg·g⁻¹)，空白组灌胃生理盐水，共给药14 d。

2.3 样品采集 给药14 d后，采用代谢笼收集沙鼠12 h尿液样本存储于离心管中。收集尿液样本时禁食不禁水，收集的尿液以3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8.6 cm，下同)。取上清分装，置于-80℃冰箱储存用于后续检测。麻醉沙鼠后，腹主动脉取血，开颅取脑，血液放置30 min后，4 000 r·min⁻¹，离心5 min，得血清。一部分脑组织放入4%多聚甲醛中固定，用于脑组织切片观察。一部分按体积比

1:100在脑组织中加入抑酞酶(稀释比1:10)后,匀浆,3 000 r·min⁻¹,离心10 min,取上清液。

2.4 神经功能评分 分别于给药第0、3、7、14天,采用Longa评分法对各组沙鼠进行神经功能缺损评分,判断各组沙鼠的神经功能恢复情况。评分标准为:无神经功能缺损为0分;轻度神经功能缺损(右前肢无法完全伸展)为1分;中度神经功能缺损(行走时向右侧旋转)为2分;重度神经功能缺损(行走时向右侧倾斜)为3分;不能自发行走,有意识障碍为4分。

2.5 脑组织梗死面积测定 采用TTC染色法检测脑梗死面积,取沙鼠大脑置于-20℃冰冻30 min,作冠状切片。把脑片放入2% TTC溶液中37℃水浴30 min。取出后用生理盐水洗去TTC,拍照并计算脑梗死率。脑梗死率=(缺血对侧脑半球体积-缺血侧非梗死体积)/缺血对侧脑半球体积×100%。

2.6 尿液代谢组学分析

2.6.1 尿液中代谢物的提取 将储存在-80℃冰箱中的冷冻尿样4℃解冻,混合均匀。移取50 μL样品至离心管中,补水至100 μL,加入400 μL提取液(甲醇-乙腈1:1,含同位素标记内标混合物),涡旋混匀30 s,超声(功率35 W,频率40 kHz)10 min(冰水浴),-40℃静置1 h,将样品4℃,12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清于进样瓶中上机检测,所有样品另取等量上清混合成质控(QC)样品上机检测。

2.6.2 色谱条件 采用Waters ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相A为含25 mmol·L⁻¹乙酸铵和25 mmol·L⁻¹氨水的水溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱(0~1 min,5%B;1~7 min,5%~50%B;7~10 min,50%~95%B;10~11 min,95%~5%B;11~12 min,5%B),样品盘温度4℃,进样体积2 μL。

2.6.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,毛细管温度320℃,辅助气流量50 arb,鞘气流量15 arb,全MS分辨率60 000,MS/MS分辨率15 000,归一化碰撞能量10/30/60,喷雾电压3.8 kV(ESI⁺)、-3.4 kV(ESI⁻)。

2.6.4 数据处理与分析 原始数据经ProteoWizard软件转成mzXML格式后,使用自主编写的R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理,然后与BiotreeDB V2.1自建二级质谱数据库匹配进行物质注释,算法打分的Cutoff值设为0.3。数据经标准化处理后导入SIMCA16.0.2软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。

2.6.5 差异代谢物的筛选与代谢通路分析 在OPLS-DA模型中,以第一主成分的变量重要性投影(VIP)值>1且t检验P<0.05为标准进行组间差异代谢物的筛选。通过差异代谢物对京都基因与基因组百科全书(KEGG)、PubChem等权威代谢物数据库进行映射,在取得差异代谢物的匹配信息后,对对应物种*Mus musculus*(mouse)的通路数据库进行搜索和代谢通路分析。采用KEGG数据库(<http://www.genome.jp/KEGG/>)结合MetaboAnalyst 5.0软件(<http://www.MetaboAnalyst.ca/>)对筛选出的差异代谢物进行代谢通路分析。

2.7 统计学处理方法 通过SPSS 21.0软件对各组间的差异代谢物进行单因素方差分析。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药效学评价

3.1.1 关白附及禹白附对中风沙鼠神经功能缺损评分的影响 造模后,各组沙鼠均表现出不同程度的神经功能缺损,说明造模成功。与空白组比较,模型组神经功能缺损评分明显升高(P<0.05),各给药组与模型组差异无统计学意义;给药7、14 d后,与模型组比较,关白附组的神经功能缺损评分降低(P<0.05);禹白附组在给药14 d后的神经功能缺损评分降低(P<0.05);组内不同给药天数与给药第0天比较,关白附组在给药7、14 d后的神经功能缺损评分明显低于给药0 d(P<0.05),禹白附组在给药7、14 d后的神经功能缺损评分明显低于与给药0 d(P<0.05)。见表1。

表1 关白附及禹白附对中风沙鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

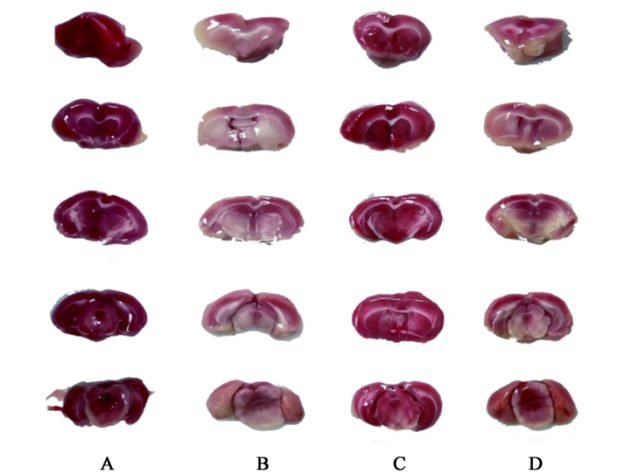
Table 1 Effect of *Aconiti Coreani Radix* and *Typhonii Rhizoma* on neurological deficit scores in stroke gerbils ($\bar{x}\pm s$, n=6) 分

组别	第0天	第3天	第7天	第14天
空白组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	3.00±0.53 ¹⁾	2.75±0.71 ¹⁾	2.87±0.64 ¹⁾	2.62±0.51 ¹⁾
关白附组	2.87±0.64	2.25±0.70	2.00±0.75 ^{2,3)}	1.50±0.53 ^{2,3)}
禹白附组	3.00±0.75	2.50±0.53	2.25±0.71 ³⁾	1.87±0.64 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与第0天比较³⁾P<0.05(表2-表4同)

3.1.2 关白附及禹白附对中风沙鼠脑梗死率的影响 各组沙鼠脑梗死情况见图1,空白组沙鼠脑内供血充足,无缺血情况;模型组沙鼠脑内缺血严重;关白附组沙鼠脑内供血大部分恢复,只有少部分存在缺血情况;禹白附组沙鼠脑内供血部分恢复。经

计算,与空白组比较,模型组沙鼠脑组织梗死率明显升高($P<0.05$),与模型组比较,关白附组和禹白附组沙鼠脑组织梗死率明显降低($P<0.05$),见表2。



注:A.空白组;B.模型组;C.关白附组;D.禹白附组
图1 关白附及禹白附对中风沙鼠脑梗死情况的影响
Fig. 1 Effect of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on cerebral infarction in stroke gerbils

3.1.3 关白附及禹白附对中风沙鼠生化指标的影响 与空白组比较,模型组沙鼠血清和脑组织中IL-6、TNF- α 、MDA水平明显升高($P<0.05$),SOD、GSH、NO水平明显降低($P<0.05$),与模型组比较,关白附组和禹白附组沙鼠血清和脑组织中TNF- α 、MDA水平明显降低,关白附组沙鼠血清中IL-6水

表2 关白附及禹白附对中风沙鼠脑梗死率的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 2 Effect of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on rate of cerebral infarction in stroke gerbils ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	脑梗死率/%
空白组	7.94 $\pm$ 0.65
模型组	34.55 $\pm$ 1.49 ¹⁾
关白附组	16.95 $\pm$ 0.39 ²⁾
禹白附组	19.61 $\pm$ 1.14 ²⁾

平明显降低($P<0.05$),SOD、GSH、NO水平明显升高($P<0.05$)。见表3、表4。

3.2 关白附及禹白附对中风沙鼠尿液代谢组学的影响

3.2.1 尿液代谢轮廓分析 PCA评分图见图2,可以看出,各组间存在一定的分离趋势,但不明显。进一步采用OPLS-DA对沙鼠尿液样品进行分析显示,各组间分离明显,聚集程度较好,说明尿液代谢物在模型组与空白组、关白附与模型组、禹白附与模型组之间存在着明显差异。为检验OPLS-DA模型是否存在过拟合现象,通过置换检验对OPLS-DA模型进行统计验证, R^2X 与 R^2Y 值越接近1表明模型拟合数据效果越好,且当 Q^2 在Y轴上的截距 <0 时表明分析模型可靠。结果表明所有的 Q^2 值均低于右侧原点,且 Q^2 的回归线在纵坐标上的截距 <0 ,表明此模型无过度拟合现象,具有良好的可预测性和拟合度,能够准确地描述数据,见图3。

表3 关白附及禹白附对中风沙鼠血清中IL-6、TNF- α 、MDA、SOD、GSH、NO水平的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 3 Effect of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on levels of IL-6, TNF- α , MDA, SOD, GSH and NO in serum of stroke gerbils ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	IL-6/ng $\cdot$ L ⁻¹	TNF- α /ng $\cdot$ L ⁻¹	MDA/nmol $\cdot$ L ⁻¹	SOD/U $\cdot$ L ⁻¹	GSH/ng $\cdot$ L ⁻¹	NO/ μ mol $\cdot$ L ⁻¹
空白组	450.35 $\pm$ 5.20	128.44 $\pm$ 3.40	9.04 $\pm$ 0.15	656.23 $\pm$ 11.15	47.55 $\pm$ 0.96	21.55 $\pm$ 0.47
模型组	652.35 $\pm$ 23.01 ¹⁾	210.85 $\pm$ 6.11 ¹⁾	13.71 $\pm$ 0.45 ¹⁾	408.23 $\pm$ 7.51 ¹⁾	29.77 $\pm$ 0.50 ¹⁾	11.59 $\pm$ 0.26 ¹⁾
关白附组	610.85 $\pm$ 22.04 ²⁾	152.91 $\pm$ 2.41 ²⁾	9.10 $\pm$ 0.46 ²⁾	539.48 $\pm$ 23.83 ²⁾	36.02 $\pm$ 1.04 ²⁾	16.53 $\pm$ 0.14 ²⁾
禹白附组	639.10 $\pm$ 22.48	189.69 $\pm$ 8.87 ²⁾	9.86 $\pm$ 0.51 ²⁾	525.10 $\pm$ 23.16 ²⁾	34.37 $\pm$ 0.65 ²⁾	18.82 $\pm$ 0.45 ²⁾

表4 关白附及禹白附对中风沙鼠脑组织中IL-6、TNF- α 、MDA、SOD、GSH、NO水平的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 4 Effect of Aconiti Coreani Radix and Typhonii Rhizoma on levels of IL-6, TNF- α , MDA, SOD, GSH and NO in brain tissues of stroke gerbils ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	IL-6/ng $\cdot$ L ⁻¹	TNF- α /ng $\cdot$ L ⁻¹	MDA/nmol $\cdot$ L ⁻¹	SOD/U $\cdot$ L ⁻¹	GSH/ng $\cdot$ L ⁻¹	NO/ μ mol $\cdot$ L ⁻¹
空白组	312.69 $\pm$ 6.51	123.55 $\pm$ 1.55	8.42 $\pm$ 0.42	719.22 $\pm$ 12.98	44.13 $\pm$ 0.60	21.58 $\pm$ 0.20
模型组	550.09 $\pm$ 9.22 ¹⁾	265.33 $\pm$ 3.42 ¹⁾	12.81 $\pm$ 0.66 ¹⁾	496.72 $\pm$ 13.22 ¹⁾	29.20 $\pm$ 0.51 ¹⁾	12.60 $\pm$ 0.16 ¹⁾
关白附组	494.13 $\pm$ 11.64 ²⁾	201.80 $\pm$ 1.59 ²⁾	9.04 $\pm$ 0.24 ²⁾	584.92 $\pm$ 4.26 ²⁾	39.83 $\pm$ 0.38 ²⁾	17.63 $\pm$ 0.18 ²⁾
禹白附组	509.90 $\pm$ 2.05 ²⁾	207.56 $\pm$ 4.49 ²⁾	9.74 $\pm$ 0.39 ²⁾	547.28 $\pm$ 6.05 ²⁾	38.13 $\pm$ 0.28 ²⁾	19.53 $\pm$ 0.28 ²⁾

3.2.2 差异代谢物的鉴定 依据OPLS-DA模型,以VIP值 >1 且 $P<0.05$ 为标准进行组间差异代谢物

的筛选。空白组与模型组共筛选出112个差异代谢物,上调16个,下调95个,可作为潜在的缺血性脑

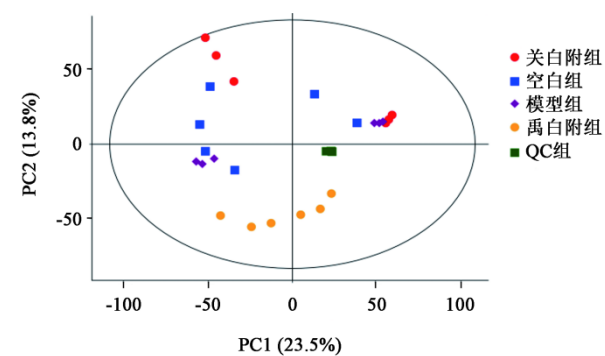


图2 各组沙鼠尿液代谢组学的PCA评分
Fig. 2 PCA scores of urine metabolomics of gerbils in each group

卒中生物标志物。关白附和禹白附分别回调了其
中16个和26个生物标志物,见表5。

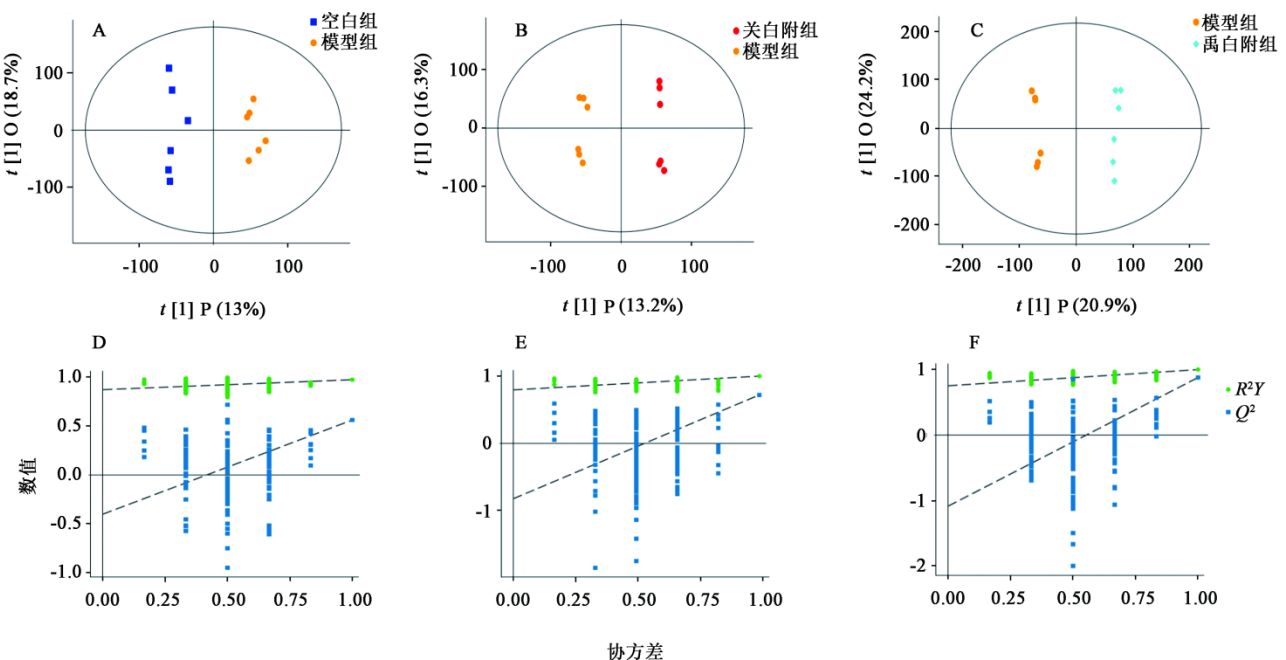
3.2.3 代谢通路分析 将所得差异代谢物进行代
谢通路拓扑分析和富集分析,结果表明,关白附主
要影响的代谢通路包括精氨酸和脯氨酸代谢、嘧
啶代谢、核黄素代谢、氨酰基-tRNA生物合成。而禹
白附主要影响的代谢通路包括精氨酸和脯氨酸代
谢,嘌呤代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,嘧
啶代谢,花生四烯酸代谢,氨酰基-tRNA生物合成,泛
酸盐和辅酶A的生物合成, β -丙氨酸代谢。气泡图见
增强出版附加材料。

4 讨论

由于沙鼠具有独特的脑血管解剖生理特性,即

缺乏后交通动脉,且 Willis 环前后半环不连续,从而
被广泛用于脑缺血病理生理机制研究^[10]。因而本
研究采用单侧结扎沙鼠颈动脉建立缺血性脑卒中
模型。研究结果显示关白附和禹白附可明显降低
中风沙鼠神经功能缺损评分,还可降低脑梗死率,
并对脑内供血恢复情况有积极作用;从生化指标结
果来看,关白附和禹白附可通过改善血清和脑组织
中各生化指标含量抑制炎症反应和调节氧化应激,
增强血管内皮细胞功能等从而缓解缺血性脑损伤。
在此基础上,进一步从代谢组学角度探讨关白附与
禹白附治疗缺血性脑卒中的作用机制,结果表明关
白附对中风沙鼠的改善作用与其尿液中16个差异
代谢物有关,且主要通过调节氨基酸代谢、氧化应
激等发挥作用等。主要涉及的差异代谢物有胞苷、
5-甲基胞苷、尿苷、2-甲氧基胞嘧啶、氧戊二酸、*L*-焦
谷氨酸、*L*-脯氨酸、核黄素。禹白附对中风沙鼠的改
善作用与其尿液中26个差异代谢物有关,禹白附除
了影响氨基酸代谢外,还通过影响脂质代谢、能量
代谢等,从而发挥抗缺血性脑卒中作用。主要涉及
的差异代谢物有肌氨酸、腺嘌呤、*N*-乙酰甘氨酸、尿
嘧啶、尿苷、氧戊二酸、*L*-焦谷氨酸、*L*-脯氨酸、鸟
苷二磷酸。

嘧啶作为组成核苷的碱基成分之一,与戊糖、
磷酸共同组成核酸,因此嘧啶碱参与并影响着机体



注:A.空白组和模型组 OPLS-DA 评分;B.空白组和模型组置换检验;C.模型组和关白附组 OPLS-DA 评分;D.模型组和关白附组置换检
验;E.模型组和禹白附组 OPLS-DA 评分;F.模型组和禹白附组置换检验

图3 各组沙鼠尿液代谢组学的OPLS-DA评分及置换检验
Fig. 3 OPLS-DA score and permutation test plots on urine metabolomics of gerbils in each group

表5 各组沙鼠尿液差异代谢物分析
Table 5 Analysis of differential metabolites of gerbil urine in each group

No.	代谢产物	VIP (模型组/空白组)	P (模型组/空白组)	模型组 /空白组	关白附组 /模型组	禹白附组 /模型组
1	肌氨酸	1.50	0.034 5	↑ ¹⁾	—	↓ ²⁾
2	N ₆ -甲基腺苷	1.70	0.001 0	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	—
3	腺嘌呤	1.91	0.021 9	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾
4	5-甲基胞苷	1.68	0.017 5	↓ ¹⁾	↑ ¹⁾	—
5	苯丙氨酰-蛋氨酸	2.09	0.002 7	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	—
6	胞苷	1.78	0.033 3	↓ ¹⁾	↑ ¹⁾	—
7	4-氨基-2-亚甲基丁酸	1.95	0.040 7	↑ ¹⁾	↓ ¹⁾	—
8	S-羧甲基-L-半胱氨酸	1.85	0.005 7	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	—
9	反式阿魏酸	1.69	0.022 3	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾
10	羟嘌呤醇	2.13	0.001 2	↑ ²⁾	—	↓ ¹⁾
11	氧戊二酸	2.13	0.002 2	↑ ²⁾	↓ ¹⁾	↓ ²⁾
12	N-乙酰甘氨酸	1.55	0.030 0	↑ ¹⁾	—	↓ ¹⁾
13	2-O-甲基胞嘧啶	1.78	0.021 4	↓ ¹⁾	↑ ¹⁾	—
14	N-乙酰腐胺	1.77	0.025 2	↓ ¹⁾	—	↑ ¹⁾
15	尿嘧啶	2.05	0.015 0	↑ ¹⁾	—	↓ ²⁾
16	4,5-二甲基恶唑	1.86	0.023 2	↓ ²⁾	—	↑ ¹⁾
17	芽子碱甲酯	1.90	0.021 4	↓ ¹⁾	—	↑ ¹⁾
18	降南天竹碱	1.45	0.007 6	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	—
19	3-甲基己二酸	2.19	0.005 0	↓ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾
20	L-脯氨酸	1.61	0.040 6	↓ ¹⁾	↑ ¹⁾	↑ ²⁾
21	1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-癸酮	2.28	0.004 7	↓ ²⁾	—	↑ ²⁾
22	根皮酚 1-O-β-D-葡萄糖苷	1.80	0.014 0	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾
23	尿苷	2.37	0.000 1	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾
24	庚二酸	2.14	0.007 1	↓ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
25	核黄素	2.17	0.007 0	↓ ²⁾	↑ ¹⁾	—
26	sakacin P	1.60	0.039 4	↓ ¹⁾	—	↑ ¹⁾
27	二氢玫瑰苷	1.98	0.019 0	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾
28	4-乙酰丁酸酯	1.33	0.039 0	↑ ¹⁾	—	↓ ¹⁾
29	L-焦谷氨酸	1.65	0.045 0	↑ ¹⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾
30	N-乙酰谷氨酸	1.95	0.010 6	↑ ¹⁾	↓ ²⁾	—
31	2-庚基苯噻唑	1.83	0.019 8	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾
32	亮氨酰-羟脯氨酸	2.25	0.002 6	↓ ²⁾	—	↑ ²⁾
33	O-丙酰基肉碱	1.72	0.035 2	↓ ¹⁾	—	↑ ¹⁾
34	白三烯 D ₄	1.73	0.024 7	↓ ¹⁾	—	↑ ¹⁾
35	二磷酸鸟苷	2.05	0.002 2	↓ ²⁾	—	↑ ²⁾
36	甘油 1-(9Z-十八碳烯酸酯)2-十四酸酯 3-磷酸酯	1.65	0.022 3	↓ ¹⁾	—	↑ ²⁾

注：↑.相对表达上调；↓.相对表达下调；—.无显著性差异；¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

的所有生理活动,其在体内最终可分解为氨、二氧化碳与水,并在酶的作用下生成的代谢中间产物可进入 TCA,进行彻底氧化,其分解的氨与二氧化碳将会生成尿素,以尿液排出体外^[11-13]。研究表明,使用注射液丹参多酚酸可通过调节嘧啶代谢治疗缺血性脑卒中,给药会使尿苷代谢增加,嘧啶分解随

之增加,随尿液排出的氨也相继增加,继而减轻脑组织的氨含量,改善脑部能量供应,减轻脑梗死症状^[14]。本研究中,与空白组比较,模型组沙鼠尿液中胞苷、尿苷、2-甲氧基胞嘧啶代谢水平显著下降,经关白附给药干预后,中风沙鼠尿液中胞苷、尿苷和2-甲氧基胞嘧啶的代谢增加,表明嘧啶分解增加,随尿液排出的氨也随之增加,可以减轻脑组织的氨含量,改善脑部能量供应,减轻脑梗死症状,达到治疗的目的,同时说明关白附对嘧啶代谢有一定调节作用。

嘌呤是核酸重要组成部分,是生物体新陈代谢中的重要物质,主要的嘌呤碱基有腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤,次黄嘌呤和黄嘌呤为嘌呤分解过程中的中间产物,最终在不同酶的作用下转化成尿酸,他们共同调节嘌呤代谢,并可进行转化^[15]。三磷酸鸟苷属于鸟嘌呤衍生物,三磷酸鸟苷差异代谢物也属于嘌呤代谢^[16]。本研究中禹白附显著回调了缺血性脑卒中后下调的腺嘌呤和鸟苷二磷酸,虽然两者与缺血性脑卒中的相关性尚未被定义,但其最终代谢产物尿酸对局灶性脑缺血/再灌注损伤具有保护作用,可通过调节核因子E₂相关因子2(Nrf2)介导的氧化应激、调节脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)表达水平从而发挥抗氧化和神经保护作用^[17]。因此推测禹白附干预后,差异代谢物腺嘌呤和鸟苷二磷酸的上调会影响尿酸进而调节嘌呤代谢从而对缺血性脑卒中产生保护作用。

大脑缺血缺氧后,造成神经功能损伤的同时,也会影响其生化代谢功能,引起代谢功能异常。表现为代谢物(兴奋性氨基酸)的异常波动,即出现氨基酸代谢紊乱,具体体现为样本中某些代谢物含量增加和降低。谷氨酸是兴奋性氨基酸(EAAs)中的一种,其浓度反映脑缺血的损伤程度。谷氨酸是中枢神经系统含量最高的兴奋性氨基酸,脑缺血时,谷氨酸过量释放浓度急剧升高产生兴奋性毒性最终导致神经元死亡^[18]。焦谷氨酸是谷氨酸的环化衍生物,焦谷氨酸的升高体现了缺血状态下神经损伤性增强^[19]。此外,也有研究表明L-脯氨酸为缺血性脑卒中损伤的潜在生物标志物之一^[20]。在人体内,脯氨酸主要由谷氨酸代谢生成,DING等^[21]发现谷氨酸衍生物焦谷氨酸和脯氨酸在缺血性脑卒中后均显著降低。夏鑫华等^[22]发现下调大脑中动脉阻塞(MACO)鼠血清中谷氨酸,焦谷氨酸水平,上调脯氨酸水平调节氨基酸代谢途径可缓解脑缺血

损伤。本研究结果显示,在关白附和禹白附给予干预后中风沙鼠尿液中焦谷氨酸含量显著下降,L-脯氨酸含量显著升高,表明两者可通过调节氨基酸代谢来发挥抗缺血性脑卒中作用。

氧戊二酸(α -酮戊二酸)是在丙酮酸脱氢酶(LDH)和异柠檬酸脱氢酶(IDH)作用下产生的,是谷氨酸合成的前体^[23]。因此,氧戊二酸的变化趋势可以间接反映兴奋性氨基酸的含量变化趋势^[24]。荷叶碱对MACO大鼠的脑保护作用可通过降低氧戊二酸含量和降低兴奋性氨基酸毒性来实现^[25]。本实验结果显示,对比空白组,模型组中差异代谢物氧戊二酸的含量显著升高,这可能表明中风沙鼠的氨基酸代谢发生紊乱。关白附和禹白附干预后,氧戊二酸含量显著降低,结果提示关白附和禹白附对中风沙鼠的保护作用是通过改变氧戊二酸含量间接影响氨基酸代谢来实现的。

甘氨酸是中枢神经系统内的重要神经递质,甘氨酸可通过调节N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体影响离子通道,增加钙离子内流,其释放增加能扩大脑缺血损害^[26]。甘氨酸作为人体内重要的代谢型氨基酸,在缺血性脑卒中发病过程中,由于氨基酸代谢紊乱,甘氨酸的表达也会显著升高^[27]。N-乙酰甘氨酸作为甘氨酸的衍生物,不仅是甘氨酸合成的重要有机中间体,也是甘氨酸生物体代谢的产物^[28]。肌氨酸是甘氨酸的甲基化衍生物,由甘氨酸通过N-甲基转移酶作用生成,在能量代谢上有重要作用^[29]。经过本研究分析发现,甘氨酸并未直接参与调节缺血性脑卒中的代谢通路中,而是通过其衍生物N-乙酰甘氨酸和肌氨酸间接参与调节。与空白组比较,模型组尿液中N-乙酰甘氨酸和肌氨酸含量增加,提示氨基酸代谢出现异常,甘氨酸可能间接参与了脑缺血损伤过程,禹白附干预后,中风沙鼠尿液中N-乙酰甘氨酸和肌氨酸含量显著降低,说明禹白附可通过降低N-乙酰甘氨酸和肌氨酸的含量,调节氨基酸代谢异常。

核黄素是一种水溶性维生素,参与多种代谢反应,在多种代谢途径中起关键作用。研究表明核黄素可以通过清除自由基的能力减轻氧化应激损伤,在脑缺血中具有神经保护作用^[30]。研究表明,核黄素明显减少MCAO引起的脑梗死面积,对大鼠缺血性脑损伤具有保护作用,其作用机制包括保护缺血时脑组织的抗氧化酶活力^[31]。核黄素也已被证明在创伤性脑损伤大鼠模型中可减少损伤程度的大小,星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白的表达和水肿

的形成,这可能是由于核黄素对氧自由基的清除活性^[32]。更有研究显示,人在中风后处于核黄素缺乏的状态^[33]。在本研究中验证了这一观点,模型组沙鼠差异代谢物核黄素显著下调,关白附干预后差异代谢物核黄素显著上调,提示关白附可能通过调节核黄素代谢发挥抗氧化作用,减轻中风后引起的脑损伤。

本研究首次通过药效学证明了关白附和禹白附均对缺血性脑卒中具有治疗作用,并从代谢组学角度探讨了关白附和禹白附作用机制的异同。本研究结果为阐明关白附和禹白附治疗缺血性脑卒中的作用机制提供了新的依据,进一步为关白附和禹白附在临床上的合理应用奠定了基础。虽然本实验已筛选出与缺血性脑卒中相关的差异代谢物及代谢通路,但仍缺乏特征性和专属性,日后将进一步采用靶向代谢组学对关白附和禹白附调节的生物标志物进一步的筛选和定量,从而建立关白附和禹白附调节缺血性脑卒中疗效评价的生物标志物。代谢组学多研究内源性小分子代谢物,但由于内源性代谢物种类繁多,仅分析尿液代谢组学,不能代表机体整体代谢物谱的所有特征,因此下一步打算对关白附和禹白附干预中风沙鼠的血清、脑组织的代谢组学进行系统研究,从而全面丰富关白附和禹白附治疗中风的作用机制。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: A report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9):139-596.
- [2] 李星星,郭文军,赵亮,等. 基于UPLC-Q-Exactive-MS代谢组学技术的蒺藜果提取物对缺血性脑中风大鼠的保护作用及机制研究[J]. *特产研究*, 2023, doi:10.16720/j.cnki.tcyj.2023.016.
- [3] 汪戎锦. 基于代谢组学的刺五加叶治疗缺血性脑卒中作用机制研究[D]. 长春:吉林大学,2021.
- [4] 刘蕾. 基于LC-MS代谢组学研究三七对脑缺血模型大鼠的脑保护作用[D]. 百色:右江民族医学院,2021.
- [5] 黄金钰,戴忠,马双成. 白附子的研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(18):2816-2822.
- [6] 辛佳芸,陈佳,徐希科,等. 基于尿液代谢组学探究龟龄集中附子炮制方法的减毒机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(4):166-174.
- [7] 韦园诗. 丹参-川芎抗缺血性脑卒中的代谢组学研究

[D]. 广州:广州中医药大学,2019.

- [8] ZHANG X, LI P, HUA Y, et al. Urinary metabolomics study the mechanism of Taohong Siwu decoction intervention in acute blood stasis model rats based on liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1074/1075:51-60.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:168
- [10] 周海倩,张丽梅,黎晓. 制备与评价脑缺血动物模型的研究现状[J]. *赣南医学院学报*, 2018, 38(10):988-993.
- [11] 姚文兵. 生物化学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2016:96-97,265.
- [12] 徐慧颖,丁奕辉,董昊,等. 麸炒苍术多糖与正丁醇部位对脾虚大鼠代谢组学的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(22):112-120.
- [13] 凌嘉阳,柏阳,曲扬,等. 基于药效学和代谢组学考察北苍术不同炮制品对脾虚大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231262.
- [14] 王靖阳,韩立峰,张晨,等. 基于代谢组学分析注射用丹参多酚酸治疗缺血性脑卒中作用机制[J]. *天津中医药*, 2022, 39(12):1502-1512.
- [15] 赵琳儒,何盼,李杰,等. 柴芩宁神颗粒改善失眠大鼠睡眠作用的海马代谢组学研究[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(7):1921-1931.
- [16] 娄天宇,马贝贝,李瑞吉,等. 基于代谢组学技术研究丹红注射液对血小板内代谢物的变化[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(13):3422-3428.
- [17] YA B L, LIU Q, LI H F, et al. Uric acid protects against focal cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress via activating Nrf2 and regulating neurotrophic factor expression [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:6069150.
- [18] 吴晓清. 加味四逆汤干预缺血性中风恢复期阳虚证患者的代谢组学研究[D]. 南宁:广西中医药大学,2021.
- [19] 姚蓓蓓. 通脑饮治疗急性缺血性卒中痰瘀阻络证的临床和代谢组学研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [20] 王华. 滋肾通络方对局灶性脑缺血大鼠神经细胞保护作用的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2009.
- [21] DING X, LIU R, LI W, et al. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in post-stroke patients with depressive disorder (PSD) [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(2):279-287.
- [22] 夏鑫华,刘梅. 基于代谢组学的补阳还五汤干预缺血

- 性脑卒中的作用机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7):1659-1662, 后插7.
- [23] 吴星星. 基于代谢组学探讨炎症性肠病及其湿热证实质的临床与实验研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2022.
- [24] MELONI B P. Pathophysiology and neuroprotective strategies in hypoxic-Ischemic brain injury and stroke [J]. Brain Sci, 2017, 7(8):110.
- [25] 吴兰兰. 荷叶碱对大鼠缺血性脑损伤的保护作用及机制研究[D]. 成都:西南交通大学, 2021.
- [26] CAPPELLI J, KHACHO P, WANG B, et al. Glycine-induced NMDA receptor internalization provides neuroprotection and preserves vasculature following ischemic stroke[J]. iScience, 2022, 25(1):103539.
- [27] OHTANI K, TANAKA H, YASUDA H, et al. Blocking the glycine-binding site of NMDA receptors prevents the progression of ischemic pathology induced by bilateral carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res, 2000, 871 (2) : 311-318.
- [28] 郭莹. *N*-乙酰甘氨酸在溶剂体系中的多元固-液相平衡研究[D]. 长春:长春工业大学, 2022.
- [29] 孙平良. 基于代谢组学的溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态变化及安肠汤干预机制研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2017.
- [30] TRIPATHI A K, DWIVEDI A, PAL M K, et al. Attenuated neuroprotective effect of riboflavin under UV-B irradiation via miR-203/c-Jun signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1):39.
- [31] 阮名花, 邹赢铤, 栾洁, 等. 核黄素抑制大鼠缺血性脑损伤[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8):1115-1121.
- [32] PLANTONE D, PARDINI M, RINALDI G. Riboflavin in neurological diseases: A narrative review [J]. Clin Drug Investig, 2021, 41(6):513-527.
- [33] GARIBALLA S, ULLEGADDI R. Riboflavin status in acute ischemic stroke [J]. Eur J Clin Nutr, 2007, 61 (10):1237-1240.
- [责任编辑 李嘉麟]