

丹红注射液调节大鼠中动脉阻塞大鼠血清氨基酸代谢谱的实验研究

郭志丽¹ 朱妍^{1,2} 肖红斌³ 王忠¹

(1 中国中医科学院,北京,100700; 2 陕西步长制药有限公司,西安,712000; 3 中国科学院大连化学物理研究所,大连,116023)

摘要 目的:利用代谢组学手段检测大鼠中动脉阻塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)模型大鼠血清中氨基酸含量,微观上阐明氨基酸注射液的疗效以及部分作用机制。方法:采用邻苯二甲醛(O-Phthalaldehyde, OPA)柱前在线衍生反相高效液相色谱法,采用荧光检测,梯度洗脱,建立了血清中氨基酸代谢谱的相对定量分析方法,测定 36 例大鼠血清中的 15 种氨基酸含量。流动相 A 为 10 mol/L Na₂HPO₄-Na₂BO₇ 缓冲液(pH=7.95),B 为乙腈-甲醇-水(45:45:15, V/V/V),线性梯度洗脱,流动相 B 在 6 min 内由 5% 增加至 17.2%,6~35 min 内由 17.2% 增加至 52%。结果:1)该法在 35 min 之内分离出 15 种氨基酸;2)经主成分分析,3 个组在空间上得到很好地分离,氨基酸代谢谱发生了一定的变化;3)利用 SPSS 方差分析,有 6 个氨基酸在分离各组有统计学意义。结论:丹红注射液通过部分调节 MCAO 摄动通路改善脑梗死大鼠血清部分氨基酸的代谢趋势。

关键词 高效液相色谱;氨基酸代谢组学;脑梗死;丝氨酸代谢

Research on Danhong Injection Adjusting Metabolic Spectrum of Serum Amino Acid in Cerebral Infarction Rats

Guo Zhili¹, Zhu Yan^{1,2}, Xiao Hongbin³, Wang Zhong¹

(1 China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China; 2 Xi'an BUCHANG Pharmaceutical Co., Ltd. Xi'an 712000, China; 3 Dalian Chemical Physics Institute, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Objective: To determine the content of amino acid to clarify the curative effect and the functioning mechanism of DanHong injection on microscopic. **Methods:** OPA reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), precolumn derivatization method fluorescence detection, gradient elution were used. Mobile phase A was 15mol/L Na₂HPO₄-Na₂BO₇ buffer (pH = 7.95), B was acetonitrile - methanol - water (45:45:15, V/V/V). As for linear gradient elution, mobile phase B in 6 min increased from 5% to 17.2%, increased from 17.2% to 52% in 6-35 min. **Results:** 1) Fifteen kinds of amino acids were isolated within 35 min; 2) using principal component analysis, three groups were well separated; 3) using the SPSS analysis of variance, there were six amino acids in the separation between groups was statistically significant. **Conclusion:** Danhong injection can improve metabolic trend of amino acid in cerebral infarction rats serum through adjusting perturbed pathways

Key Words HPLC; Amino acid; Cerebral infarction; Serine metabolism; Metabolomics

中图分类号:R285.5;R743.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.03.031

氨基酸作为代谢网络中重要的代谢物,与脑梗死存在相关性^[1]。脑梗死的病理生理机制尚不清楚,应用代谢组学的科学性,通过数学建模用于研究药物靶标和数据挖掘很有意义^[2]。氨基酸代谢系统分析,在生物学研究当中是一个主要范例,将帮助我们确定新的药物靶点反过来又会更深入地了解脑梗死的产生机制,从而更好的指导药物发现^[3]。本实验通过氨基酸类代谢谱的代谢组学法,建立了血清氨基酸代谢谱柱前在线衍生化 HPLC-FLD 方法,应用了代谢组学使用的超高效液相色谱结合模式识别方法的平台,用于研究代谢和疾病的相关性。

1 实验部分

1.1 样品采集与预处理

1.1.1 造模方法 参照 Longa 等的线栓法,略做改进。用 15% 水合氯醛(4 mL/kg, ip)麻醉大鼠。将麻醉后的大鼠仰卧位固定,消毒皮肤,铺无菌洞巾,近正中

切口,分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎颈总动脉、颈外动脉,于颈总动脉分叉切口处向颈内动脉插入栓线约(18.5±0.5) mm,感觉有阻力即达大脑中动脉起始部,完全阻断其血流,结扎颈内动脉。所用栓线为直径 0.2 mm 尼龙渔线。头段烧圆,顶端直径约(0.25~0.28) mm。术中室温在(27±0.5)℃,术中用白炽灯加温,辅助电热毯保温,维持大鼠肛温约 37℃。术后缝合伤口,动物回笼 1 h 后拔出渔线,即造成缺血再灌注模型^[3]。以 MCAO 大鼠为实验对象,空白对照组 9 只,模型组 6 只,丹红注射液给药组 21 只(DH1 = 1 mg/kg, DH2 = 2.5 mg/kg, DH3 = 5 mg/kg, DH4 = 10 mg/kg),分别于造模后 3 d, 3 次给药,按照实验设计的药物剂量,于鼠尾静脉注射给药。第 3 d 给药处死后,腹腔静脉取血,静置后取血清离心取得血清 500 μL/只,于超低温(-80℃)保存造模成功后,取血清并于超低温保存。

精密量取血清样品 150 μL , 加入纯水 800 μL , 内标溶液(正缬氨酸 250 ng/mL) 150 μL , 混匀取上清液 200 μL , 加入 85% 甲醇 800 μL , 涡旋混合震荡 5 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 离心 (12 000 r/min 15 min), 取上清液 200 μL , 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 装于液相小瓶中进行在线衍生 HPLC - FLD 方法检测。

1.2 仪器与试剂 Agilent 1200 型高效液相色谱系统, 配备可变波长荧光检测器(美国 Agilent 公司)。氨基酸对照品: 出峰顺序: 氨基酸对照品: 天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、色氨酸(TRP)、丝氨酸(SER)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、牛磺酸(Tau)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、鸟氨酸(Orn)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys), 正缬氨酸(Nor) 购于美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 国产分析纯; OPA 3-巯基乙酸(美国 Accostandard 公司); 乙腈和甲醇为色谱纯; Milli-Q 超低有机物超纯水机(美国 Millipore 公司) 制备的超纯水, 实验在中国科学院大连化学物理研究所进行。丹红注射液原液的来源(陕西步长制药有限公司提供)。

1.3 在线衍生化方法 OPA 为衍生试剂: 量取 OPA 储备液(10 mg/mL) 1 mL, 加入硼酸盐缓冲液(pH = 10.2) 1 mL, 再加入 3-巯基乙醇(3-MPA) 100 μL , 混匀后, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 待用。衍生化过程在 Agilent 1200 自动进样器上在线自动完成。衍生化过程在 Agilent 1200 自动进样器上在线自动完成, 程序如下: 吸取磷酸盐缓冲液(pH = 15.2) 50 μL ; 吸取样品、OPA 衍生试剂各 5 μL , 充分混合 5 次, 等待 1 min, 进样。

1.4 血清氨基酸高效液相色谱分析 色谱条件样品室温度设为 5 $^{\circ}\text{C}$; Hypersil C_{18} 反相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 大连依利特公司); 流动相 A 液: 15 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH = 7.95 缓冲液, B 液为乙腈: 甲醇: 水(体积比为 45: 45: 15)。梯度洗脱条件是梯度洗脱: 流动相 B 在 6 min 内由 5% 增加至 17.2%, 6 ~ 35 min 内由 17.2% 增加至 52%; 荧光检测波长 338 nm(谱带宽 10 nm), 参考波长 390 nm(谱带宽 15 nm)。进样量为 5 μL [4]。

2 方法学考察

2.1 标准曲线制作 在 0.05 ~ 150 mg/mL 浓度范围内, 将 15 种氨基酸分别按照 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度配置成 5 个等级的液相小瓶, 每个 μg 级标准品配成两瓶, 每个样品进针 3 次。由 5 个浓度水平来绘制校正曲线。以峰面积为纵坐标, 目标物相应的浓度为横坐标做校正曲线, 得

回归方程。15 种氨基酸峰面积和浓度之间的线性相关系数 r 值在 0.953 4 ~ 0.999 2 之间。

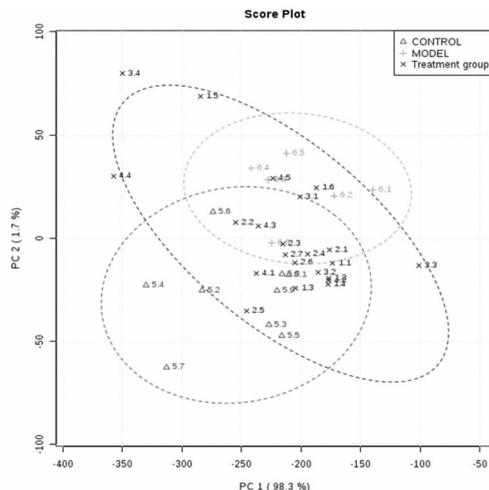


图1 PCA 空白组(C)和模型组(M), 给药组(T)血清样品散点分布图(t[Comp. 1]/t[Comp. 2]) 图中标标准分组

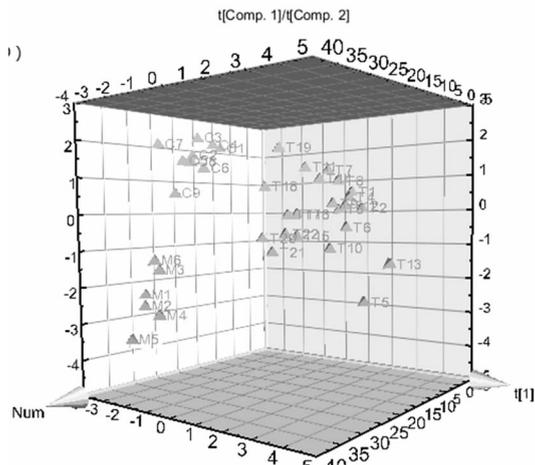


图2 空白组(C)和模型组(M), 给药组(T)血清样品 PCA3D 分布图(t[Comp. 1]/t[Comp. 2])

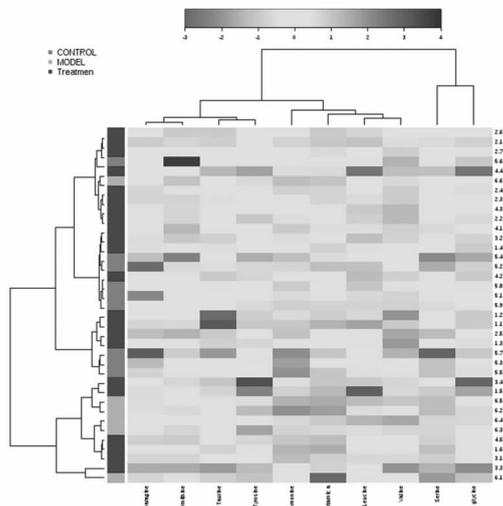


图3 聚类分析热图

2.2 精密度试验 标准溶液连续 5 次进样, 15 种氨基

酸的保留时间和峰面积的变异系数分别为 0.09% ~ 0.28% 和 0.8% ~ 4.2%。

2.3 重复性试验 取 15 份样品依法进行测定,日内、日间变异系数均 < 7.5%。

2.4 加样回收率试验 3 个空白样品中添加低、中、高三个浓度水平的标准品完成,通过对比检测的量和实际加入的量来计算,结果平均回收率在 89.2% ~ 152.6% 之间。

表 1 对区分对照组、模型组、治疗组大鼠有显著贡献的差异代谢物

组别	对照组	模型组	治疗组			
			DH1	DH2	DH3	DH4
天冬氨酸	32.67 ± 10.28 [△]	36.64 ± 5.25	13.12 ± 6.28 [*]	13.15 ± 3.06 [*]	14.48 ± 2.05 [*]	15.28 ± 3.9 ^{**}
谷氨酸	50.05 ± 7.26 [△]	64.91 ± 13.23	22.19 ± 7.44 [*]	29.96 ± 7.2 [*]	29.61 ± 6.97 [*]	40.20 ± 13.03 ^{**}
丝氨酸	17.57 ± 5.87 [△]	10.49 ± 1.32	10.27 ± 1.51 [*]	10.49 ± 3.81 [*]	8.91 ± 1.04 [*]	11.28 ± 2.21 [*]
天冬酰胺	147.51 ± 30.3 [△]	77.39 ± 22.17	95.19 ± 18.79 [*]	102.23 ± 27.84	103.80 ± 11.11 [*]	114.6 ± 24.65 [*]
苏氨酸	29.64 ± 10.15	45.46 ± 9.32	35.43 ± 22.89 [*]	38.14 ± 14.94 [*]	47.87 ± 11.35	51.10 ± 21.58 [*]
缬氨酸	11.7 ± 3.32 ^{△△}	17.09 ± 2.27	28.40 ± 13.28 [*]	17.40 ± 7.95 [*]	15.69 ± 3.3	18.66 ± 4.77 ^{**}

注:空白对照组与模型组比较, [△] 为 $P < 0.05$, ^{△△} 为 $P < 0.01$; 药物组与模型组比较: ^{*} 为 $P < 0.05$, ^{**} 为 $P < 0.01$ 。

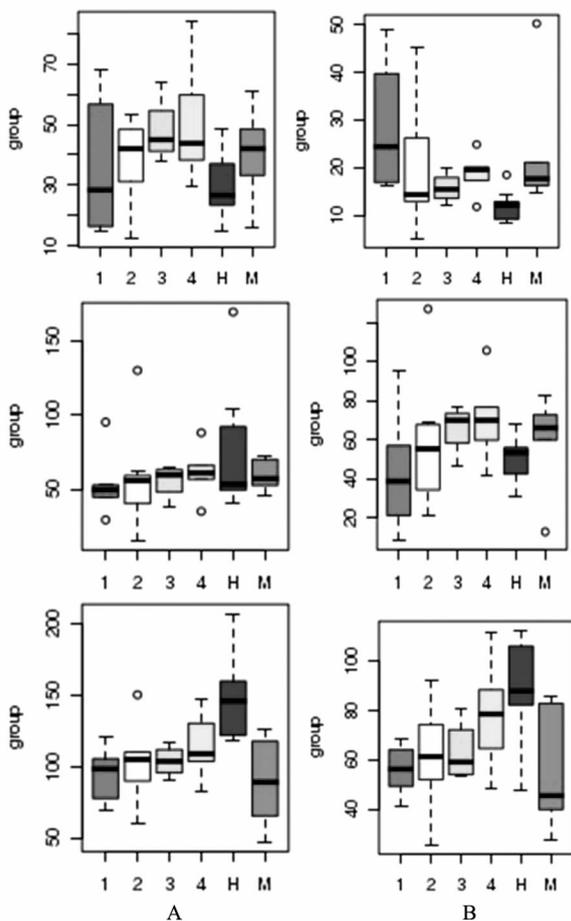


图 4 上述差异代谢物在 4 组大鼠血清中的含量变化趋势

3 结果与讨论

3.1 HPLC 数据分析结果 用此方法测定了 36 例大鼠血清氨基酸代谢谱,将峰面积数据化,采用安捷伦自带分析软件对样品氨基酸峰面积进行自动积分,如果未在响应值范围之内进行手动积分,得出峰面积结果。将各个氨基酸峰面积值除以内标面积值,以减少误差,用于最终统计。以相对峰面积作为原始数据,通过吸光度与浓度值建立了回归曲线。将积分值进行中心化

和比例换算,用 Simca - P12.0 (UmetricsAB, Umea, Sweden) 软件进行 PCA 分析,求出主成分 (Principal Components, PC), 利用 PCA 对各组大鼠血清的氨基酸图谱进行分析。如图 1 与图 2 所示,治疗组与空白对照组、模型组在平面图和三维图上均得到了很好的分离,说明 3 个组在代谢图谱上产生了一定的差异。

3.2 MCAO 大鼠血清差异氨基酸含量变化 为考察丹红注射液对 MCAO 大鼠血清代谢谱的影响,同样对对照组、模型组和治疗组 3 组大鼠进行差异代谢物筛选。MCAO 大鼠经丹红注射液给药干预后,其血清代谢轮廓较模型组趋近于正常对照组,表明丹红注射液对大鼠整体的代谢通路起到了一定的调节作用,使之往正常水平变化。经 SPSS 软件分析,如表 1 显示,丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酸以及谷氨酸等代谢物对分类起了重要作用。

3.3 丹红注射液干预作用差异的探讨与差异代谢物解释 图 4 A 为上述差异代谢物在 4 组大鼠血清中的含量比较。在 MCAO 大鼠血清中,丝氨酸、天冬酰胺、甘氨酸含量均显著性降低 (t 检验, $P < 0.05$), 而谷氨酸、苏氨酸、天冬氨酸含量则显著性升高 ($P < 0.05$)。而药物组则显著下调了谷氨酸、苏氨酸、天冬氨酸和上调了丝氨酸、天冬酰胺、甘氨酸。MCAO 大鼠经丹红注射液干预后,PCA 得分图显示其整体代谢轮廓往正常大鼠方向偏移,说明 MCAO 引起紊乱的代谢通路整体上得到了调节,丹红注射液可以在一定程度上改善大鼠 MCAO 的状态。图 4 B 为 6 个氨基酸在各个组的含量变化趋势,提示随着剂量的上升,氨基酸的含量趋向于空白对照组。

3.4 差异代谢物的作用方式 经过检索 HMDB 得出生物学意义,天门冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu) 属于兴奋性氨基酸,在脑缺血区域产生兴奋毒性,而丝氨酸

(Ser)及其代谢产物在生物体新陈代谢以及在中枢神经系统发挥的特定功能是必不可少的^[5],如图5显示,人体内与丝氨酸相关的代谢物,其中前六位正是检测出来的6个差异代谢物,提示差异代谢物与丝氨酸代谢相关且在细胞增殖以及中枢神经系统上有着特定功能。前期研究提示,在精神疾病患者和严重的丝氨酸合成障碍的神经系统异常的患者中发现了丝氨酸以及甘氨酸含量的改变,这一发现均证明了丝氨酸在大脑发育和功能的重要性^[6-7],可以做进一步的实验来验证这些目标生物标记物质的存在。

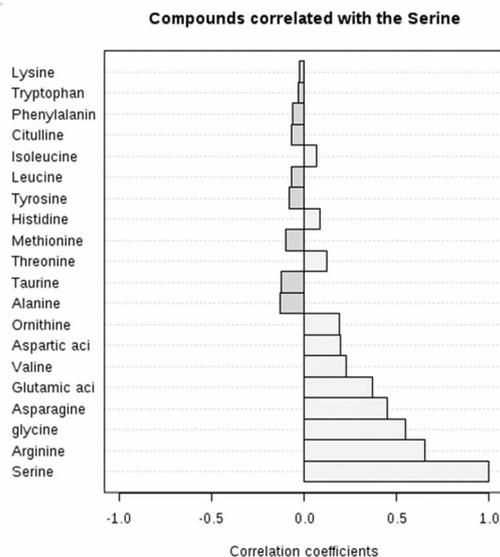


图5 与丝氨酸相关的氨基酸代谢物

丝氨酸高度集中在所有细胞膜,其合成来自四个可能的来源:饮食摄入;生物糖酵解中间产物三磷酸甘油酸酯降解;甘氨酸转化;蛋白质和磷脂降解。在生物合成途径中,糖酵解中间产物三磷酸甘油酸转化为磷酸稀式丙酮酸,在三磷酸甘油酸盐脱氢酶以及转氨酶的催化反应下,磷酸丝氨酸由磷酸丝氨酸磷酸酶转化为丝氨酸。苏氨酸在哺乳动物中的分解代谢似乎主要是由活动的苏氨酸脱氢酶氧化苏氨酸,形成氨基酸和乙酰辅酶a。苏氨酸血清浓度增加会直接导致苏氨酸和甘氨酸在大脑中积累产生毒性^[8-9]。

“BCAA”是指缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸是支链氨基酸。缬氨酸缺乏是以大脑神经缺陷为标志,许多类型的BCAA先天性代谢存在的各种异常情况都关联到一系列普遍的症状,比如精神发育迟滞,共济失调,低血糖,脊髓肌肉萎缩,皮疹,呕吐和过度的肌肉运动等^[10]。

4 结论

通过分析各个差异代谢物质在大脑中的发生作用的方式得出结果,丹红注射液牵连效应可能是通过介

导的神经递质、酶、信号转导^[11]。这些结果表明,丹红注射液疗效发生在代谢系统的多个方面。

丹红注射液是目前国内销量最大的中药注射剂,通过微观分析来看它可以调节一些在病理状态下出现差错的小分子^[12-13],也可以加强一些特异分子向健康状态下转变过程的转换作用,代谢组学技术的应用研究会增加我们理解脑梗死病理生理过程^[14],这应该会帮助我们识别潜在的生物标记物来开发新的治疗策略,进而澄清药物的通路和途径,帮助指导临床试验预测,解释观察药物作用机制,能使我们增加对代谢组学的掌控能力。

参考文献

- [1]王喜军,张爱华,杨波. 代谢组学:中药效应评价的有效途径[P]. 黑龙江中医药大学,科学技术部行业专项(200807014).
- [2]曹蓓,王广基,阿基业. 代谢组学在临床研究中的应用及进展[J]. 生命科学,2010,22(8):761-769.
- [3]于正,梁繁荣. 代谢组学在心血管疾病方面的研究进展[J]. 中国医学科学院学报,2012,34(4):413-416.
- [4]韩晓菲,黄宇虹,王龙星,等. 血清氨基酸代谢谱与糖尿病相关性研究[J]. 分析化学简报,2013,20(5):697-701.
- [5]贾伟,蒋健,刘平. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2006,31(8):621-624.
- [6]夏鑫华,刘梅,李欢. 局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的代谢组学研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(7):841-843.
- [7]林艳萍,司端运,刘昌孝. 液相色谱和质谱联用技术结合化学计量学应用于代谢组学的研究进展[J]. 分析化学,2007,35(10):1535-1540.
- [8]戴红,张宗才,张新申. 氨基酸分析的检测方法评述[J]. 皮革科学与工程,2004,14(3):39-43.
- [9]王刚,曾南,杜士明. 代谢组学在中药现代化研究中的应用进展[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(16):1393-1391.
- [10]Makinen, G. Finn D M. Ala K. 1H-NMR metabolomics approach to the disease continuum of diabetic complications and premature death [J]. Mol Syst Biol,2008,4:167-169.
- [11]Schauer, NY, Roessner, A. Gur, I. et al. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement [J]. Nat Biotechnol,2011,24(4):447-454.
- [12]Sommer, M. O, Church G. M. Dantas G. et al. A functional metagenomic approach for expanding the synthetic biology toolbox for biomass conversion [J]. Mol Syst Biol,2010,6:360-365.
- [13]戴伟东. 基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学方法用于中药通心络和人参对过度疲劳大鼠干预作用的评价[J]. Chinese Journal,2011,29(11):1049-1054.
- [14]石洁,胡元会. 代谢组学及其在心血管疾病中的研究进展[J]. 中医药研究,2011,28(1):86-88.