

参附注射液对心源性休克大鼠血浆内源性物质的影响

杜婷^{1,2}, 李冰涛², 张启云², 李洋², 章林霞², 徐国良^{2*}

(1. 湖北医药学院附属十堰市太和医院药学部, 湖北 十堰 442000;

2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨参附注射液对心源性休克大鼠血浆中内源性物质的影响。**方法:**32 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组和给药组, 每组 8 只。除空白组外, 其余各组均采用结扎左冠状动脉法复制大鼠心源性休克模型, 阳性对照组给予 0.82 mg·kg⁻¹多巴胺注射液, 给药组给予 10 mL·kg⁻¹参附注射液, 空白组和模型组给予生理盐水。给药 45 min 后, 心尖取血, HPLC-MS 测定大鼠体内内源性物质含量, 采用主成分分析法分析组间差别, 正交信号校正和偏最小二乘法判别分析法分析可能的生物标记物。**结果:**主成分分析结果显示空白组、模型组、对照组和给药组之间无样本点重合。正交信号校正偏最小二乘法分析显示大鼠血浆中肌酸、3-hydroxydodecanoic acid、花生四烯酸、溶血磷脂质等物质在实验各组间发生了相应的变化。**结论:**参附注射液对心源性休克模型大鼠血浆中内源性物质及其整体状态具有明显的影响, 肌酸、精胺、3-hydroxydodecanoic acid、花生四烯酸、溶血磷脂质等可能是潜在生物标记物。

[关键词] 参附注射液; 心源性休克; 内源性物质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0254-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120921.1553.001.html>

[网络出版时间] 2012-09-26 15:53

Effect of Shenfu Injection on Endogenous Substances in Plasma of Acute Cardiogenic Shock Rats

DU Ting^{1,2}, LI Bing-tao², ZHANG Qi-yun², LI Yang², ZHANG Lin-xia², XU Guo-liang^{2*}

(1. Taihe Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Jiangxi University
of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Shenfu injection on endogenous substances in plasma of acute cardiogenic shock rats. **Method:** Thirty-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, positive group, administration group, with ten rats in each group. Each group was made by blocking left coronary artery except the control group, the positive group was administrated with Dopamine injection. the administration group was administrated with Shenfu injection. The control group and model group were only administrated with normal saline. Forty-five minutes later, plasma was collected from cardiac apex. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to analyze the endogenous compounds, principal component analysis (PCA) was used to observe the difference between the four groups, and orthogonal signal correction-partial least square was used to discriminate analysis (OSC-PLS-DA) of biomarkers. **Result:** In the scatter plot of PCA, there was no samples coincidence among the four group. The further analysis on loading plot of OSC-PLS-DA indicated

[收稿日期] 20120222(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960513);国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB530603)

[第一作者] 杜婷, 硕士, 从事药理学方面研究, E-mail: duting0606@163.com

[通讯作者] * 徐国良, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究和教学, Tel:0719-7118657, E-mail: xuguoliang6606@126.com

that creatine, 3-hydroxydodecanoic acid, arachidonic acid, lysophospholipid. etc have changed in the different groups. **Conclusion:** Shenfu injection has important effect on the endogenous substances in the acute cardiogenic shock rats. Creatine, spermine, 3-hydroxydodecanoic acid, arachidonic acid, lysophospholipid may be the potential biomarkers.

[**Key words**] Shenfu injection; cardiogenic shock; endogenous substances

参附注射液源自《校注妇人良方》卷九之参附汤,具有回阳救逆、益气固脱之功效,主治阳气暴脱的厥脱证及阴虚所致的惊悸怔忡、咳喘、胃痛泄泻、痹证等。现代研究表明其具有抑菌抗病毒、抗过敏性反应,影响细胞因子表达的活性。临床主要用于充血性心力衰竭、心律失常等病证,对感染中毒性休克等多种休克有显著疗效^[1]。

代谢组学应用现代分析结合化学计量学技术,分析由于病理生理学变化引起的生物体液、组织中内源性代谢产物谱,进而研究生物体的整体状况^[2]。研究方法上与中医药理论的整体观、系统论相一致,有利于使中医药及其理论走向科学化、定量化。

本课题组应用代谢组学的方法研究参附注射液对心源性休克大鼠血浆中内源性物质及其整体状态的影响,进一步的研究参附注射液对心源性休克的治疗作用,对于进一步深入研究参附注射液药效的科学内涵具有重要的意义。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠32只,SPF级,雄性,体重(300±20)g,由湖南斯莱克景达动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2009-0004。饲养在本院动物实验室适应饲养2周后开始实验。

1.2 试剂及仪器 参附注射液(批号201101,雅安三九药业有限公司),乌拉坦(批号28135,上海阿拉丁试剂有限公司),生理盐水注射液(批号H10983065,江西科伦药业有限公司),肝素钠(批号H8060,北京索莱宝科技有限公司),去离子水、甲酸(Fluka, USA),乙腈(TD, USA),甲醇(色谱醇,山东禹王),其他试剂均为分析纯。

TGA358型1/万分析天平(北京Sartorius公司),SZ-97A型自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),TL-5.0W型台式离心机(上海市离心机械研究所),Sigma3-18k型低温高速离心机(Sartorius, Germany),Agilent1200 6410 Triple Quadrupole型质谱仪(Agilent Technologies),BF2000型氮吹仪(八方世纪),移液枪(Finpeppte, France)。

BIOPAC. SystemsMP150多道生理信号采集仪

(美国),DW-3000型小动物呼吸机(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

数据处理软件:SIMCA-P+12.0软件包(UmetricsAB, Sweden),SQL Server 2000(Microsoft, USA),SPSS 13.0(SPSS .inc, USA)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药方法 大鼠32只按体重随机分为空白组、模型组、阳性对照组、参附给药组,每组8只。除空白组以外其余各实验组均采用结扎左冠状动脉法复制大鼠心源性休克模型。具体造模方法:20%乌拉坦(1000 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,将其固定在手术台上。经口行气管插管术,分离左股动脉,插管测血压。分离右股静脉,以备输液。稳定20 min后,记录各指标作为基础值。开胸后迅速开呼吸机,剪开心包膜,提起心脏结扎左前降支,闭合胸腔,同时记录各指标。以平均动脉压(MAP)降至原血压70%以下视为休克^[3],如达不到该标准,再次从冠脉左回旋支远端向近端结扎,持续观察10 min,如果血压不再回升,则视为心源性休克模型成立。造模成功后开始静脉注射给药,BIOPAC多导生理记录仪采集实时血压值。给药组给予参附注射液10 mL·kg⁻¹,阳性对照组给予多巴胺注射液(0.82 mg·kg⁻¹)并用生理盐水溶液补充容积至10 mL·kg⁻¹,空白组、模型组注射相应体积生理盐水溶液10 mL·kg⁻¹。

2.2 血压测定、样品采集及样品前处理 左股动脉插管实时监测血压值,给药后45 min,心脏取血1.2 mL,血液放置含肝素的1.5 mL EP管中,混匀,静置2 h内离心,离心条件(3000 r·min⁻¹,10 min),取上清液(血浆),-20℃保存备用。

将冻存血浆室温解冻,取50 μL血浆于1.5 mL EP管,加甲醇150 μL。涡旋混匀1 min,4℃恒温静置3 h,离心(15000 r·min⁻¹,10 min,10℃)后取上清液与1.5 mL EP管,30℃氮气吹干,加水-甲醇溶液(水-甲醇80:20)100 μL定容,涡旋混匀1 min,离心(18000 r·min⁻¹,15 min,10℃),取上清液于样品瓶,进样。

2.3 色谱及质谱方法 Agilent Zorbax Eclipse SB-

具有较大的影响。这些因素的客观存在影响生物标记物变量的正确判定。本实验应用正交信号校正(OSC)的方法来消除外源性因素的影响,然后应用偏最小二乘法模型的U型图,根据模型重要性系数(VIP)和变量相关系数 $[P(\text{corr})]$ 来筛选潜在生物

标记物变量,筛选 $VIP > 1, |P(\text{corr})| > 0.7$ 的变量(m/z)成为可能的生物标记物^[5]。对大鼠血浆实验数据进行OSC-PLS分析后的U型图见图4,按上述实验方法筛选的部分潜在生物标记物通过查找相关网站,初步判定的生物标记物见表2。

表2 参附注射液对心源性休克大鼠影响的部分潜在生物标记物变量

$[M+H]^+$	变量重要程度	趋势	可能的物质	生物学功能
114	1.086 4	↓	1-吡咯啉-5-羧酸	三羧酸循环代谢产物
132	2.316 6	↓	肌酸	有效提高肌力、速度和耐力
217.1	4.402 9	↑	3-hydroxydodecanoic acid	脂肪代谢紊乱
305.1	12.386	↑	花生四烯酸	介导炎症反应的产生
349.1	4.062 8	↑	肌苷酸	肌肉和其他组织内的核苷酸
496.2	13.606 5	↓	LysoPC(16:1(9Z))	能量来源,细胞信号转导
518.2	5.779	↓	溶血磷脂质	能使红细胞及其他细胞膜破裂,与溶血或细胞坏死有关

4 讨论

在测定了参附注射液的药动力学参数基础上^[6],应用血浆代谢组学的方法进一步研究了参附注射液对心源性休克大鼠血浆中内源性物质状态的影响,研究显示给予参附注射液后心源性休克大鼠血浆中肌酸、3-hydroxydodecanoic acid、花生四烯酸、肌苷酸、hysoPC[16:1(9Z)]、溶血磷脂质等6种内源性物质重要性系数较高。其中肌酸能够快速的再合成ATP(三磷酸腺苷)以供给能量^[7],LysoPC[16:1(9Z)]与能量来源有关,两者均呈现下降趋势,提示心源性休克后机体能量供应不足呈下降趋势,给予参附注射液后没能得到良好改善;3-hydroxydodecanoic acid与脂肪代谢紊乱有关,它呈上升趋势提示脂肪和蛋白质分解代谢紊乱,其结果导致高乳酸血症及代谢性酸中毒,酸中毒可损伤血管内皮,诱发DIC,激活溶酶体酶,损伤细胞^[8];花生四烯酸是前列腺素 E_2 (PGE_2)、血栓烷素(TXA_2)和白三烯的直接前体,这些生物活性物质对脂质蛋白的代谢、血管弹性、白细胞功能等具有重要的调节作用,并介导炎症反应产生^[9],花生四烯酸呈现上升趋势,提示其对以上功能呈正调节;溶血磷脂质呈现下降趋势,提示细胞受损程度减少^[10-11]。另外,重要性系数较低的生物标记物1-吡咯啉-5-羧酸属三羧酸循环代谢产物之一,而三羧酸循环是糖、脂肪酸和某些氨基酸相互转变的代谢枢纽,它的降低提示三者之间的转换水平降低,与上述能量供应不足的结果一致。综上所述,结果提示给予参附注射液后,心源性休克大鼠血浆中与脂肪代谢、炎症、血流动力学有关的内源性物质均发生了变化,但是其具体机制和代谢路径有待进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] 徐军,漏洪刚,楼宜嘉,等.参附注射液药理作用的研究进展[J].上海中医药杂志,2008,42(10):87.
- [2] Nieholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomies': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29: 1181.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2000:1045.
- [4] 张启云,李冰涛,徐国良,等.干姜对大鼠尿液内源性代谢物的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2010,24(5):354.
- [5] 汤喜兰,徐国良,李冰涛,等.花椒水提取物给药大鼠尿液代谢组学研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):127.
- [6] 杜婷,孙荣进,徐国良,等.药理效应法测定参附注射液药动力学参数的研究[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(1):69.
- [7] 金宏,许志勤,王先远,等.肌酸对游泳大鼠乳酸、糖原含量和乳酸脱氢酶活性的影响[J].氨基酸和生物资源,2001,23(3):39.
- [8] 杜微,刘大为.重症患者的高乳酸血症与代谢性酸中毒[J].中华临床营养杂志,2011,19(3):183.
- [9] 陶迎秋,梁统,周克元,等.花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用[J].国际免疫学杂志,2010,33(4):303.
- [10] 宋颖,曲秀芬.溶血磷脂酸溶血磷脂酸与心血管系统疾病[J].国外医学:心血管病分册,2003,30(6):345.
- [11] 杨大智,陈庆伟,李春莉,等.参附注射液治疗犬心源性休克的细胞因子机制研究[J].中国中药杂志,2007,32(21):2273.

[责任编辑 邹晓翠]