

· 药物代谢 ·

矿物药青礞石对PTZ点燃癫痫大鼠影响的 脑组织代谢组学分析

刘圣金¹, 吴露婷¹, 马瑜璐¹, 房方¹, 杨文国¹, 单晨啸¹, 卞勇¹,
严辉¹, 张志杰², 奥·乌力吉³, 段金廛^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,
中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,
国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 南京 210023;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 内蒙古民族大学, 内蒙古通辽 028000)

[摘要] 目的:通过青礞石干预戊四氮(PTZ)点燃癫痫大鼠的脑组织代谢组学研究,探讨青礞石治疗癫痫可能的作用机制。方法:运用PTZ点燃法建立大鼠癫痫动物模型,实验分为空白组、模型组、卡马西平组、青礞石组。通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC/Q-TOF-MS)技术检测脑组织样品,利用偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和SPSS 18.0软件等方式对实验结果进行统计分析。结果:建立了大鼠脑组织代谢指纹图谱、代谢轮廓图,显示各组代谢轮廓发生了明显的变化,各组间均能很好地分开,并且青礞石组较卡马西平组有更靠近空白组的趋势。筛选出了7个差异代谢物,包括磷脂酰丝氨酸(PS)(18:0/18:0)、L-谷氨酸,二十二碳六烯酰基乙醇酰胺,花生四烯酸,葡糖鞘氨醇,胆甾烷-3,7,12,24,25-五醇,溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)(P-18:0)。除二十二碳六烯酰基乙醇酰胺和LysoPC(P-18:0)外,青礞石对其他5个差异代谢物均有显著性干预调节作用。影响PTZ点燃大鼠发生代谢紊乱的可能代谢通路有12条,较为重要的代谢通路有3条,即D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及花生四烯酸代谢,其中又以D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢最为重要。结论:从脑组织代谢组学分析来看,青礞石对PTZ癫痫大鼠具有明确的干预作用,这可能与干预以上差异代谢物含量及相关代谢通路有关,可减少兴奋性神经递质对脑组织神经元的毒性作用以及抑制脑组织炎症的发展以维持脑细胞的生物学功能而减缓癫痫发生。

[关键词] 矿物药; 青礞石; 癫痫; 戊四氮(PTZ); 脑组织; 代谢组学; 作用机制

[中图分类号] R22;R74;R28;R96;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0076-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210150

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201119.1619.005.html>

[网络出版日期] 2020-11-19 16:36

Metabolomics Analysis of Chloriti Lapis on Brain Tissue of PTZ-kindled Epileptic Rats

LIU Sheng-jin¹, WU Lu-ting¹, MA Yu-lu¹, FANG Fang¹, YANG Wen-guo¹, SHAN Chen-xiao¹,
BIAN Yong¹, YAN Hui¹, ZHANG Zhi-jie², AO Wu-li-ji³, DUAN Jin-ao^{1*}

(1. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization,
National Administration of Traditional Chinese Medicine, National and Local Collaborative Engineering
Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine,
Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,
China; 3. Inner Mongolia University For Nationalities, Tongliao 028000, China)

[收稿日期] 20200909(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673566,81303178);全国矿物药资源普查项目(2019);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18-1608);2017年中医药公共卫生服务补助专项(财社[2017]66号)

[第一作者] 刘圣金,博士,副教授,从事中药鉴定、品质评价及质量标准研究,Tel:025-85811511,E-mail:lsj@njucm.edu.cn

[通信作者] *段金廛,博士,教授,从事中药资源化学与资源循环利用研究,Tel:025-85811116,E-mail:dja@njucm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Chloriti Lapis in the treatment of epilepsy by the metabonomics of brain tissue in pentylenetetrazol (PTZ)-kindled epileptic rats treated with Chloriti Lapis. **Method:** The epileptic animal model in rats was established by PTZ kindling, and the rats were divided into the control group, model group, carbamazepine group and Chloriti Lapis group. The brain tissue samples were detected by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS), and the experimental results were statistically analyzed by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and SPSS 18.0. **Result:** The metabolic fingerprints and metabolic profiles of the rat brain tissue were established, which showed that the metabolic profiles of each group had changed significantly and could be separated well among the groups. Moreover, the Chloriti Lapis group had a tendency to be closer to the control group than the carbamazepine group. Seven differential metabolites were screened, including phosphatidylserine (PS) (18:0/18:0), *L*-glutamic acid, docosahexaenoyl ethanolamide, arachidonic acid, glucosylsphingosine, cholestane-3, 7, 12, 24, 25-pentol and lysophosphatidylcholine (LysoPC) (P-18:0). Except for docosahexaenoyl ethanolamide and LysoPC (P-18:0), Chloriti Lapis had significant intervening and regulating effects on the other five differential metabolites. There were 12 possible metabolic pathways that affected the metabolic disorder of PTZ-kindled rats, and 3 important metabolic pathways (pathway impact > 0.1), namely, *D*-glutamine and *D*-glutamate metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and arachidonic acid metabolism, among which *D*-glutamine and *D*-glutamate metabolism was the most important metabolic pathways. **Conclusion:** From this point of view, Chloriti Lapis has a clear intervention effect on PTZ-kindled epileptic rats, which may be related to the intervention of the above differential metabolite contents and related metabolic pathways. It can reduce the toxic effect of excitatory neurotransmitters on neurons in brain tissue and inhibit the development of inflammation in brain tissue, so as to maintain the biological function of brain cells and slow down the occurrence of epilepsy.

[Key words] mineral Chinese medicines; Chloriti Lapis; epilepsy; pentylenetetrazol (PTZ); brain tissue; metabonomics; mechanism of action

青礞石为临床常用矿物药之一,系变质岩类黑云母片岩或绿泥石化云母碳酸盐片岩。主产于河南、河北、浙江、湖南、湖北等地。性平,味甘、咸。归肺、心、肝经。具有坠痰下气、平肝镇惊之功效,用于顽痰胶结、咳逆喘急、癫痫发狂、烦躁胸闷、惊风抽搐^[1-3]。临床除用于呃逆、顽痰固疾等肺病外,还常用于治疗癫痫、精神分裂症、小儿多发性抽动症等^[4-5]。

癫痫(EP)俗称羊癫风,大发作时表现为突然昏倒,四肢抽搐,口吐白沫,两目上视,发出叫声等;小发作时表现为目睛直视,口角牵动,吮嘴等,会出现瞬间的神志模糊^[6]。中医学将癫痫发病机制分为风、火、痰、瘀、虚,或惊、痰、风、瘀、虚,其发生大多与先天因素、脑部外伤、饮食不当、劳累过度等有关,致使脏腑失调、痰浊阻滞、气机逆乱、风阳内动^[7-9]。现代医学认为癫痫是一种慢性脑部疾病,可由多种因素引起,特征是由脑细胞过度放电造成反复性发作,同时伴随各种不同的临床及检验表现,认为其发病机制包括神经元电位异常、中枢神经系

统递质异常、电解质与微量元素的影响、免疫功能异常、细胞能量代谢障碍、遗传因素等^[10-11]。

本课题组前期研究表明,青礞石能显著降低戊四氮(PTZ)点燃癫痫大鼠大脑皮层、海马组织中兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)含量,增加甘氨酸(Gly)和 γ -氨基丁酸(GABA)抑制性神经递质的相对含量^[12];能降低大鼠海马区的病变程度、提高总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力、降低丙二醛(MDA)含量、升高 Na^+ , K^+ -三磷酸腺苷酶(ATPase)及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase活性、降低神经型一氧化氮合成酶(nNOS)的蛋白表达等^[13]。癫痫的发病部位在脑,因此本实验拟进行青礞石干预PTZ点燃癫痫大鼠的脑组织代谢组学研究,应用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC/Q-TOF-MS)技术对大鼠脑组织中内源性代谢物变化进行表征和辨识,寻找各组大鼠体内差异代谢物,以期进一步揭示青礞石治疗癫痫疾病可能的作用机制。

1 材料

ACQUITY™ UPLC 型液相色谱系统, Synapt™

Q-TOF型质谱仪[配有Lock-spray接口,电喷雾离子源(ESI)和MassLynx 4.1质谱工作站](美国Waters公司);T18型分散机(德国IKA公司),Allegra X-22R型冷冻离心机(德国Beckman Coulter公司),Direct-Q型超纯水仪(德国Merck Millipore公司),JE2002型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司),MS105DU型1/10万电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

青礞石药材由亳州矿石专营店提供(批号20140412),经南京中医药大学中药鉴定学教研室吴德康教授鉴定为青礞石Chloriti Lapis,经南京大学地球科学与工程学院孔庆友教授鉴定为变质岩类黑云母片岩,样品留存于南京中医药大学中药鉴定学教研室;戊四氮(PTZ,美国Sigma公司,批号1001603974),卡马西平片(北京诺华制药有限公司,国药准字H11022279,批号20150316),水为超纯水,甲醇、乙腈及甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级SD雄性大鼠50只,购于浙江省实验动物中心,合格证号SCXK(浙)2014-0001,体质量200~220 g。大鼠在适宜条件下适应性喂养1周,自由饮食。本文涉及的动物实验经南京中医药大学伦理委员会审核通过,批准号ACU140608。

2 方法

2.1 PTZ点燃癫痫大鼠模型的制备^[12-19] 用生理盐水将PTZ配制成0.01 g·mL⁻¹的溶液,每日固定时间给大鼠腹腔注射PTZ(剂量35 mg·kg⁻¹)。持续注射4周后,暂停1周,第6周再用相同剂量的PTZ进行测试,凡连续显示5次Ⅱ级或Ⅱ级以上惊厥的大鼠被认为达到点燃标准。大鼠痫性发作分级参照Racine标准^[20]:0级为无抽搐发作;Ⅰ级为面部抽搐和孤立性肌痉挛;Ⅱ级为全身性痉挛抽搐;Ⅲ级为全身性痉挛呈无明显间歇的癫痫持续状态或抽搐致死;Ⅳ级为全身性强直-痉挛抽搐,伴站立和跌倒;Ⅴ级为同Ⅳ级反复发作呈无明显间歇的癫痫持续状态或抽搐致死。其中大鼠若出现持续Ⅴ级发作,给予7%水合氯醛1 mL缓解发作。

2.2 分组与给药 生理盐水处理的大鼠作为空白组(10只),成功造模的大鼠分为3组,即模型组(13只),卡马西平阳性药组(卡马西平组,10只)和青礞石粉末给药组(青礞石组,13只)。卡马西平组每日按0.1 g·kg⁻¹给予卡马西平溶液灌胃;青礞石组每日按2 g·kg⁻¹给予青礞石粉末混悬液灌胃(等效剂量的4倍,临床用量的20倍)。空白组、模型组均按剂量

5 mL·kg⁻¹灌胃给予生理盐水^[12-13]。连续给药6周。每周2次根据大鼠体质量调整剂量。

2.3 给药样品的制备 取青礞石药材,去除石英等杂质,置玛瑙研钵中研磨成粉末,过六号筛。以聚乙二醇400为介质调匀,使每10 mL聚乙二醇400含青礞石粉末5 g。卡马西平片用生理盐水配制成质量浓度为0.02 g·mL⁻¹的混悬液,每次给药前超声混匀。

2.4 样品采集及处理 给药第6周,处死大鼠,在冰袋上断头取脑,脑组织在冰冷的生理盐水中漂洗后,用滤纸吸干多余水分。称取脑组织0.1 mg置于10 mL离心管中,加入80%甲醇1 mL,用匀浆机充分混匀,13 000 r·min⁻¹离心处理10 min(离心半径16 cm),取上清过0.22 μm微孔滤膜,待测。

2.5 检测条件 色谱条件为流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min,95%~55%A;3~13 min,55%~5%A;13~14 min,5%A;14~16 min,5%~95%A),ACQUITY BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),柱温35 °C,流速0.4 mL·min⁻¹,进样量2 μL。质谱条件为ESI,毛细管电压3.0 kV,离子源温度120 °C,脱溶剂气温度350 °C,锥孔电压35 V,锥孔气流量50 L·h⁻¹,脱溶剂流量600 L·h⁻¹,在碰撞能量为4 eV情况下,扫描时间0.3 s,间隔扫描时间0.02 s。准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin, ESI⁺ m/z 556.277 1, ESI⁻ m/z 554.261 5)溶液为锁定质量溶液,质量扫描范围m/z 100~1 000。数据处理参数设置详见表1。

表1 大鼠脑组织样品的质谱分析参数

Table 1 Parameters of mass spectrometry analysis of rat brain tissue samples

项目	参数	项目	参数
保留时间(t _R)	0~16 min	峰强度阈值	50
质量扫描范围 m/z	100~1 000	保留时间窗口	0.20 min
质量数容忍范围	0.02 Da	噪音消除水平	6.0
质量窗口	0.05 Da	是否采集同位素数据	是
5%峰高处峰宽	1.00	是否使用相对 t _R	否
峰与峰的基线噪音	0	是否进行平滑处理	否

2.6 方法学考察 采用质控(QC)样品进行方法验证。每个脑组织样品各取20 μL进行混合,制得QC样品。分析前,先测定QC样品6次,每测定10个样品,再运行检测1次QC样品。选取特征峰明显的代谢物,以其峰面积、质量数和 t_R 等对样品分析方法进行验证。

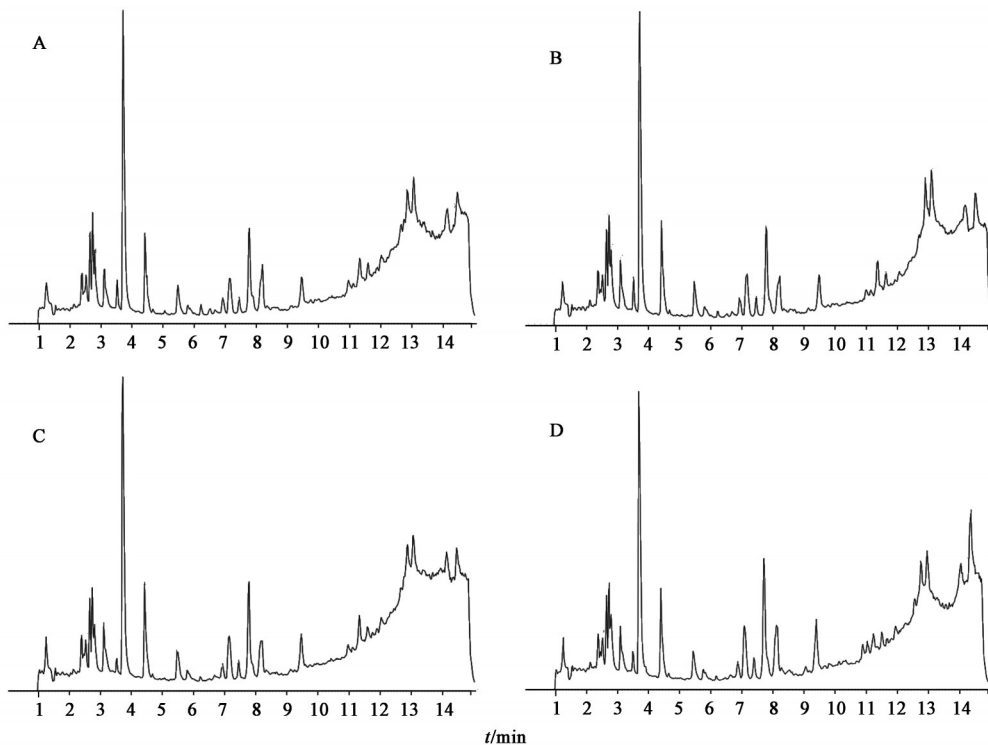
2.7 数据处理与分析 采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,经方差齐性检验后,采用*t*检验分析两组间的差异,多组间比较采用单因素方差分析。结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 方法学验证 在正、负离子模式下分别选取脑组织样品代谢图谱中的特征峰,计算 t_R 及峰面积的RSD。结果在正离子模式下,代谢物(m/z 7.76~

496.34, 9.47~524.375, 1.31~120.079) t_R 和峰面积的RSD分别为0~0.2%,6.0%~8.9%;在负离子模式下,代谢物(m/z 12.98~281.249, 14.35~282.262, 7.69~480.312) t_R 和峰面积的RSD分别为0~0.2%,0.2%~4.8%。均满足系统稳定性的分析要求。

3.2 脑组织代谢图谱 在UPLC/Q-TOF-MS系统中的正、负离子模式下分别对脑组织样品进行分析,得到各组大鼠的脑组织代谢指纹图谱,见图1,2。



A. 空白组;B. 模型组;C. 卡马西平组;D. 青礞石组(图2~4同)

图1 正离子模式下各组大鼠脑组织UPLC/Q-TOF-MS分析的TIC
Fig. 1 TIC of rat brain tissue in positive mode by UPLC/Q-TOF-MS

3.3 脑组织代谢组学分析 采用偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)对空白组、模型组、卡马西平组和青礞石组大鼠脑组织的UPLC/Q-TOF-MS数据进行分析,见图3。结果发现各组均能很好分开,说明代谢轮廓均发生了明显变化。空白组和模型组能很好的分开,说明造模成功;卡马西平和青礞石组也能很好的与模型组分开,并且青礞石组较卡马西平组有更靠近空白组的趋势,提示卡马西平和青礞石均能起到抑制PTZ点燃大鼠癫痫的作用,且青礞石干预效果更优。为寻找出与癫痫直接相关的内源性差异代谢物,探讨青礞石对这些差异代谢物的影响,阐明青礞石干预PTZ点燃癫痫大鼠的可能作用机制,将空白组和模型组进行比较,以期寻找出癫痫标志性的代谢产物,采用正交偏最小二乘法-判别

分析(OPLS-DA)进行分析,见图4。为衡量变量对分类的重要程度,选取变量重要性投影(VIP)值>1的变量作为潜在差异代谢物,进行半定量分析,将两组进行*t*检验,其中 $P<0.05$ 的代谢物视为具有显著统计学意义的差异代谢物。

3.4 差异代谢物筛选与确定 根据初步筛选结果,结合UPLC/Q-TOF-MS得到精确相对分子质量、二级质谱等信息,进行文献及在线数据库的查找、比对。最终在空白组和模型组大鼠的脑组织中共鉴定出7潜在差异代谢物,见表2。其中有4个代谢物在正、负离子模式下均被鉴定,即磷脂酰丝氨酸(PS)(18:0/18:0),花生四烯酸,胆甾烷-3,7,12,24,25-五醇和溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)(P-18:0)。潜在差异代谢物在各组大鼠中的相对强度见表3。

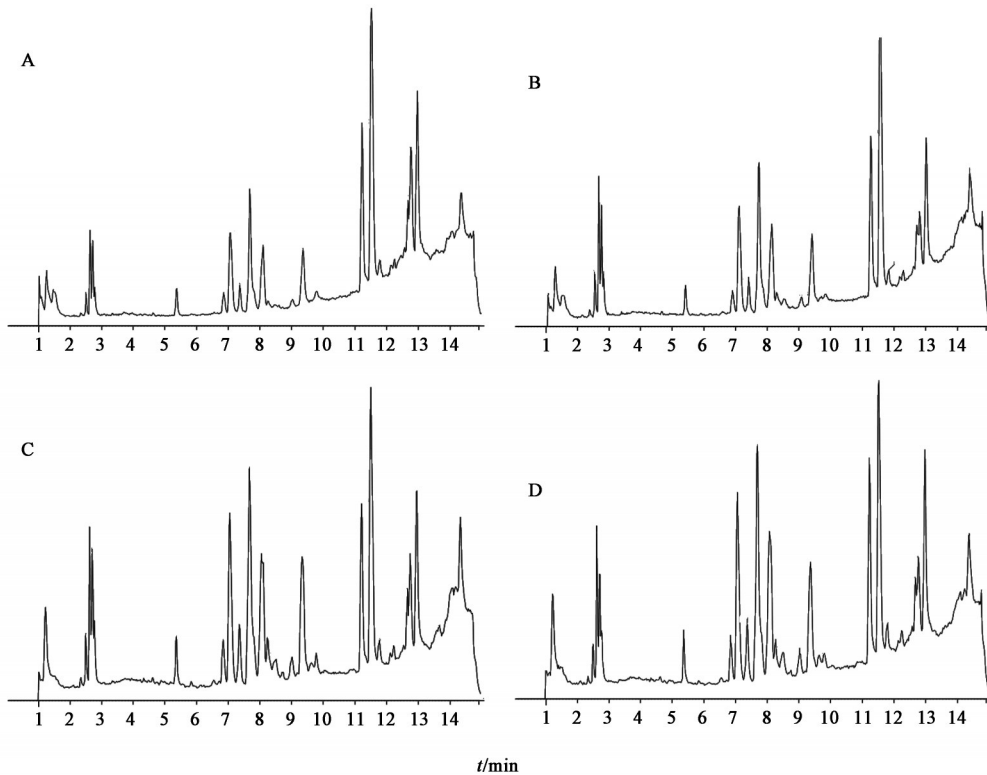


图2 负离子模式下各组大鼠脑组织 UPLC/Q-TOF-MS 分析的 TIC
Fig. 2 TIC of rat brain tissue in negative mode by UPLC/Q-TOF-MS

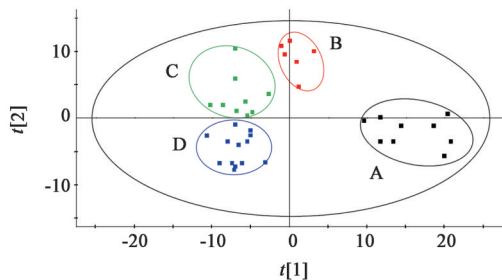


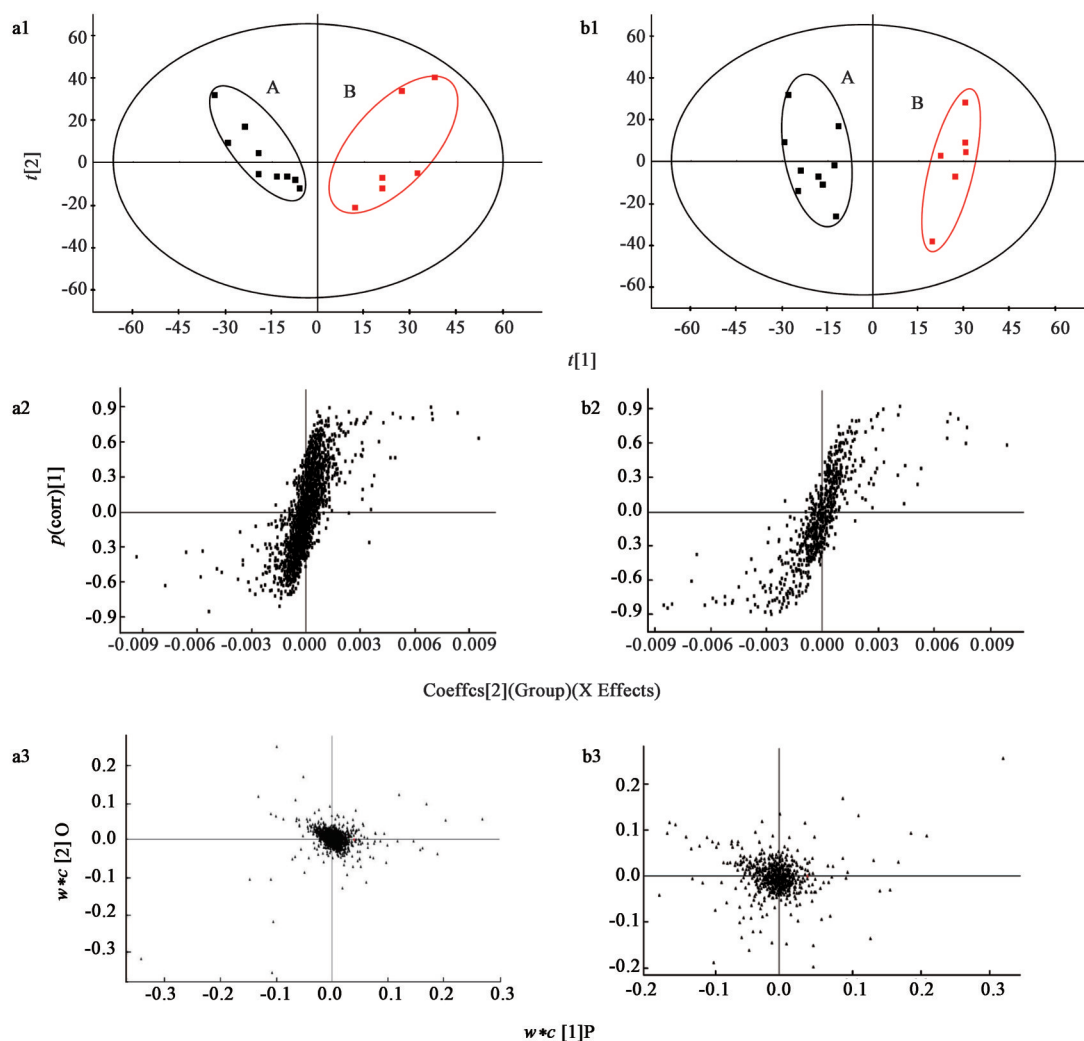
图3 给药6周后各组大鼠脑组织样品的 PLS-DA 得分
Fig. 3 PLS-DA scoring plot of brain tissue samples of rats in each group after 6 weeks of administration

3.5 代谢通路分析 将鉴定出的7个差异代谢物输入 MetaboAnalyst 3.5 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 数据库进行通路分析, 见表4。结果表明PTZ点燃大鼠发生代谢紊乱可能与12条代谢通路相关, 包括氮代谢 (nitrogen metabolism), 丁酸代谢 (butanoate metabolism), 卟啉和叶绿素代谢 (porphyrin and chlorophyll metabolism), 氨酰基-tRNA 的生物合成 (aminoacyl-tRNA biosynthesis) 等。其中影响比较重要的[通路影响值 (pathway impact) > 0.1] 代谢通路有3条, 即D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 花生四烯酸代谢。其中影响最为重要的是D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢, 其详细代谢通路见图5。

4 讨论

4.1 数据分析及动物模型制备 采用 OPLS-DA 处理空白组和模型组大鼠的代谢物信息, 得到PTZ点燃癫痫大鼠模型的标志性代谢产物, 进而运用单因素方差分析进行组间比较, 得各组中这些差异代谢物的变化趋势。将筛选得到的具有显著差异的代谢物的保留时间、相对分子质量以及质谱信息, 在 HMDB 和 Metlin 等在线数据库中进行代谢物的初步查找 (将质量误差统一设为 1.0×10^{-5}), 得到其来源、碎片离子、化合物描述等信息, 再通过 PubMed 等学术网站进行文献比对, 进一步确定。最后将鉴定出的差异代谢物的信息输入 MetaboAnalyst 3.5 中进行代谢通路分析。将通路影响值的临界值设为 0.1, 高于该值的通路作为潜在的靶标路径^[21-22]。此外, 由于制备动物模型的周期较长 (6周), 制备过程中约有 10% 动物死亡现象出现。模型制备完成后, 尚需给药6周, 模型组动物需继续给药维持癫痫状态, 在完成模型制备后的死亡率会随着给药时间的延长不断升高, 在给药第4~5周时, 模型组动物死亡率近 40%, 为确保实验分析的样本数, 建议该动物模型制备时以及分配模型组动物时需适当增加数量。

4.2 作用机制分析 本实验运用 UPLC/Q-TOF-MS



a. 正离子模式; b. 负离子模式; 1. OPLS-DA得分; 2. S-plot分析; 3. 载荷分析

图4 不同离子模式下两组大鼠脑组织的OPLS-DA处理

Fig. 4 OPLS-DA analysis of rat brain tissue in control and mode group under different ion modes

表2 空白组、模型组大鼠脑组织中的差异代谢物分析

Table 2 Analysis of differential metabolites in brain tissue of rats from control group and model group

No.	t_R /min	m/z	VIP值	分子式	差异代谢物	ESI	趋势 ¹⁾	HMDB
1	2.79	792.595	6.74	$C_{46}H_{82}NO_{10}$	PS(18:0/18:0)	+	↓	12378
	2.73	790.575	4.16			-	↓	
2	1.29	148.062	2.39	$C_5H_9NO_4$	L-谷氨酸	+	↓	00148
3	5.08	372.311	2.21	$C_{24}H_{37}NO_2$	二十二碳六烯酰基乙醇酰胺	+	↑	13658
4	11.56	305.249	1.20	$C_{20}H_{32}O_2$	花生四烯酸	+	↑	01043
	11.54	303.233	5.01			-	↓	
5	5.58	462.418	1.12	$C_{24}H_{47}NO_7$	葡糖鞘氨醇	+	↓	00596
6	2.40	453.340	6.09	$C_{27}H_{48}O_5$	胆甾烷-3,7,12,24,25-五醇	+	↓	02208
	2.38	451.328	2.02			-	↓	
7	9.68	508.341	1.22	$C_{26}H_{54}NO_6P$	LysoPC(P-18:0)	+	↑	13122
	9.62	506.325	1.12			-	↑	

注: HMDB. 人类代谢组数据库; ¹⁾空白组与模型组比较, ↑. 代谢物含量上升; ↓. 代谢物含量下降。

表 3 不同差异代谢物在各组大鼠脑组织中的相对强度

Table 3 Relative intensities of differential metabolites in brain tissue of rats from each group

差异代谢物	模式	空白组	模型组	卡马西平组	青礞石组
PS(18:0/18:0)	+	123.82±12.25 ²⁾	154.73±18.91	148.04±21.71	128.44±19.71 ²⁾
	-	75.36±12.40 ²⁾	109.36±15.89	125.71±20.16	87.39±11.64 ¹⁾
L-谷氨酸	+	9.05±2.12 ²⁾	14.14±2.70	8.04±2.22 ²⁾	10.93±1.51 ²⁾
二十二碳六烯酰基乙醇酰胺	+	16.15±8.30	10.34±2.35	10.40±6.20	10.38±4.59
花生四烯酸	+	19.91±2.54	18.05±1.92	14.27±2.22 ²⁾	15.15±1.81 ²⁾
	-	1 235.18±55.83 ¹⁾	1 355.02±97.24	1 189.44±101.81 ²⁾	1 176.37±96.78 ²⁾
葡糖鞘氨醇	+	1.35±0.51 ²⁾	2.98±1.04	1.85±0.63 ¹⁾	1.58±0.90 ²⁾
胆甾烷-3,7,12,24,25-五醇	+	50.58±6.58 ²⁾	75.55±17.50	54.72±8.11 ²⁾	57.34±12.73 ²⁾
	-	11.81±1.57 ²⁾	19.42±4.57	17.80±3.75	15.86±2.20 ¹⁾
LysoPC(P-18:0)	+	3.29±1.45	2.45±0.98	2.88±1.12	2.74±1.10
	-	16.03±7.82	12.01±5.31	16.09±6.33	13.24±5.27

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

表 4 各组大鼠脑组织中差异代谢物的通路分析

Table 4 Pathway analysis of differential metabolites in rat brain tissue

No.	通路	代谢物总数/个	通路期望值	原始 P	-lgP	通路影响值
1	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	5	0.014 3	0.014 2	4.254	1.000 0
2	花生四烯酸代谢	36	0.102 7	0.098 9	2.313	0.326 0
3	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	24	0.068 5	0.066 8	2.706	0.259 5
4	精氨酸和脯氨酸代谢	44	0.125 5	0.119 9	2.121	0.093 5
5	谷胱甘肽代谢	26	0.074 2	0.072 2	2.628	0.055 3
6	甘油磷脂代谢	30	0.085 6	0.083 0	2.489	0.044 4
7	氮代谢	9	0.025 7	0.025 5	3.671	0
8	组氨酸代谢	15	0.042 6	0.042 2	3.166	0
9	丁酸代谢	20	0.057 1	0.055 9	2.884	0
10	卟啉和叶绿素代谢	27	0.077 0	0.074 9	2.591	0
11	不饱和脂肪酸的生物合成	42	0.119 8	0.114 7	2.166	0
12	氨基酸-tRNA 的生物合成	67	0.191 2	0.178 1	1.726	0

注:各通路含有差异代谢物的匹配数(hits)均为 1 个。

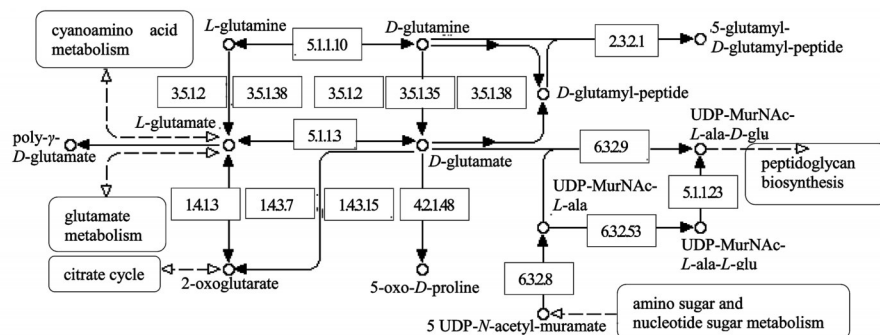


图 5 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路的归类分析

Fig. 5 Classification and analysis of metabolic pathway of D-glutamine and D-glutamate

技术对各组大鼠的脑组织进行了代谢组学研究,建立了大鼠脑组织代谢指纹图谱、代谢轮廓图,并筛

选出了 7 个差异代谢物。在青礞石给药干预后,差异代谢物趋于正常,其中对 PS(18:0/18:0),L-谷氨

酸,花生四烯酸,葡糖鞘氨醇,胆甾烷-3,7,12,24,25-五醇5个差异代谢物有显著性调节作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。将筛选出的7个差异代谢物进行通路分析,发现影响PTZ点燃大鼠发生代谢紊乱的可能代谢通路有12条,较为重要的代谢通路有3条,其中又以D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢最为重要。

谷氨酸是中枢神经系统中介导快速兴奋性突触反应的重要神经递质,广泛分布于神经系统的大脑皮层、小脑、基底神经核等部位,是脑组织中最重要兴奋性氨基酸,且谷氨酸是常用的致病剂,因为谷氨酸引起神经元异常放电的机制与卒中后癫痫相似,多用于卒中后癫痫的体外研究^[23-27]。谷氨酸以及谷氨酸能系统过度活跃介导的兴奋毒性在癫痫发作过程中起关键作用,且脑组织中谷氨酸浓度增高与认知障碍之间存在相关性^[28-29]。谷氨酸通过激活N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体会引起一氧化氮(NO)合成增加,诱导型NO合酶或神经元型NO合酶的释放在大鼠癫痫发作及其认知障碍中发挥重要作用^[30-31]。组氨酸是体内必需氨基酸,组氨酸脱羧酶(HDC)将组氨酸转化为组胺,组胺作为脑内一种重要的神经递质,发挥多种神经调节作用,脑内低组胺水平容易诱发精神分裂症、癫痫以及失眠等^[32]。在本实验中,给予青礞石干预后,PTZ点燃癫痫大鼠L-谷氨酸水平显著降低。而L-谷氨酸主要参与D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,谷胱甘肽代谢,组氨酸代谢等。说明青礞石可能是通过对以上通路的调节来降低L-谷氨酸对脑组织神经元的毒性作用。

花生四烯酸代谢产物前列腺素(PG)和白细胞三烯(LT)与癫痫发生可能存在着密切联系。环氧化酶-2(COX-2)和5-脂氧合酶(5-LOX)是花生四烯酸代谢通路上的关键酶,二者分别为PG和LT生物合成的重要限速酶,是免疫炎症反应的关键调节因子,在炎症反应中起着重要的作用。PG和LT通过作用在各自的细胞膜受体上,促进炎症的发展,改变炎症区域内细胞的生物学功能,进而导致癫痫发生^[33]。花生四烯酸除了参与炎症反应外,还可以通过刺激钙离子释放调控酶活性,在星形胶质细胞内以复杂方式干扰细胞内游离的Ca²⁺^[34]。花生四烯酸的前体是亚油酸,本实验中青礞石组的花生四烯酸含量较模型组下降,可能与其通过干预亚油酸代谢,进而影响花生四烯酸的合成有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 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,2020:207-208.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002.
- [4] 吴露婷,刘圣金,吴德康,等. 矿物类中药重镇安神药理作用及临床运用研究进展[J]. 中国现代中药, 2015,17(9):892-898.
- [5] 刘圣金,吴德康,刘训红,等. 青礞石的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(10):109-112.
- [6] 庄永森. 中医痫证与西医癫痫发病机理与临床之研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2007.
- [7] 黄斌. 癫痫中西医论治[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:125-166.
- [8] 张晶,张洪斌. 祛痰药物在癫痫治疗中的应用[J]. 山东中医杂志,2003,22(2):73-74.
- [9] 刘金民,江涛. 中医癫痫病证诊治标准化的思考[J]. 中西医结合学报,2006,4(6):572-574.
- [10] 周树舜. 癫痫学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1987:101-104.
- [11] 郑香春,刘金民,江涛. 中医药治疗癫痫的几点思考与对策[J]. 吉林中医药,2008,28(2):92-94.
- [12] 刘圣金,吴露婷,吴德康,等. 矿物药青礞石对PTZ点燃癫痫大鼠脑组织中氨基酸神经递质含量的影响[J]. 质谱学报,2016,37(6):533-541.
- [13] 吴露婷,刘圣金,吴德康,等. 矿物药青礞石对戊四氮点燃癫痫大鼠干预作用研究[J]. 中药材,2016,39(1):155-159.
- [14] 孟喜君,王峰,李传坤. 白藜芦醇对戊四氮致痫大鼠的学习记忆能力的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2013,12(3):227-231.
- [15] 徐国龙,杨帆,章复清,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对PTZ点燃型癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响[J]. 中国医药学报,2002,17(3):165-167.
- [16] 王艺,李智平,施忆赟. 戊四氮点燃大鼠慢性癫痫模型的建立及评价[J]. 复旦学报:医学版,2006,33(2):206-208,228.
- [17] LI Z P, ZHANG X Y, LU X, et al. Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus[J]. Neurochem Int, 2004,44(4):263-270.
- [18] AKSOY D, SOLMAZ V, ERBAS O. Positive effect of calcitonin on the seizures induced by pentylentetrazole in rats[J]. Epilepsy Res, 2014, 108(3):390-395.

- [19] 慕宝龙,田茸,舍雅莉,等. 平痫颗粒对癫痫大鼠海马神经元细胞凋亡及基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(6):35-37.
- [20] SAHU S, DUTTA G, MANDAL N, et al. Anticonvulsant effect of *Marsilea quadrifolia* Linn. on pentylenetetrazole induced seizure: a behavioral and EEG study in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1):537-541.
- [21] 迪丽索耶尔·亚勒坤木,付佳琪,于栋华,等. 灵芝多糖对辐射损伤小鼠影响的胸腺代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(3):102-109.
- [22] 张聪,刘建勋,孙明谦,等. 塞络通胶囊治疗急性脑缺血模型大鼠的代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(14):136-141.
- [23] 王珍,刘庆莹,朱长庚. IL-1 β 对L-谷氨酸致痫大鼠大脑皮质和海马腺苷酸环化酶表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2003,12(4):376-378.
- [24] 徐漫欢,王小同. 谷氨酸N-甲基-D-天冬氨酸受体与癫痫认知功能障碍[J]. 医学综述,2007,13(22):1745-1747.
- [25] CIENFUEGOS J A, MARTÍNEZ P, BAIXAULI J, et al. Perineural Invasion is a major prognostic and predictive factor of response to adjuvant chemotherapy in stage I - II colon cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2017, 24(4):1077-1084.
- [26] 曾春梅,雷丹青,孙兰凤,等. 致痫大鼠海马谷氨酸及 γ -氨基丁酸在痫性发作后含量变化规律[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2019,39(11):1571-1574.
- [27] 顾友余,陈文杰,秦炯,等. 癫痫研究中常用的体外模型及啮齿类动物模型[J]. 生理科学进展,2019,50(5):375-379.
- [28] GAO F, GAO Y, MENG F L, et al. The sphingosine 1-phosphate analogue FTY720 alleviates seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in rat hippocampus [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2018, 123(1):14-20.
- [29] KUMAR A, LALITHA S, MISHRA J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice [J]. Epilepsy Behav, 2013, 29(1):103-111.
- [30] SHAFAROODI H, OVEISI S, HOSSEINI M, et al. The effect of acute aripiprazole treatment on chemically and electrically induced seizures in mice: the role of nitric oxide [J]. Epilepsy Behav, 2015, 48:35-40.
- [31] 闫霞霞,郑辑英,李满,等. 癫痫伴发认知障碍发病机制的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019,17(24):3967-3969.
- [32] GISKEØDEGÅRD G F, DAVIES S K, REVELL V L, et al. Diurnal rhythms in the human urine metabolome during sleep and total sleep deprivation [J]. Sci Rep, 2015, 5:14843.
- [33] 林青,牛祥雨,金国飞,等. 姜黄素对匹罗卡品致癫痫大鼠海马COX-2和5-LOX表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(9):2224-2227.
- [34] 李褒曼. 抗单、双向抑郁症药物对星形胶质细胞作用的研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2009.

[责任编辑 刘德文]