

当归对大鼠缺血性脑损伤代谢物的影响*

陈文学^{1,2} 廖维靖³ 刘 华³ 白国允^{1,2} 岳 勇¹ 邓 风^{1,4} 雷 煥¹ 刘买利¹ 叶朝辉¹

摘要 目的:观察大鼠缺血性脑损伤对大、小脑波谱的影响以及当归对大鼠缺血性脑损伤代谢物质的变化。方法:18只雄性Wistar大鼠,体重150—200g,随机分成正常对照组(n=6)、缺血组(n=6)、当归治疗组(n=6)。采用大脑中动脉阻断法(middle cerebral artery occlusion,MCAO)制作大鼠急性脑缺血损伤模型,缺血3h后,恢复血供或当归治疗,采用离体高分辨魔角旋转波谱(¹H HR MAS NMR)技术检测,观察大、小脑波谱中胆碱(Cho)、肌酸(Cre)、N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、γ-氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)等共振峰的变化。结果:除Cho,Glu,Asp升高,大鼠急性脑缺血时大多数代谢物含量均明显低于正常对照组,经当归治疗后其代谢物的含量会有所增加。结论:缺血严重影响大、小脑神经元的存活和物质代谢,当归对大鼠缺血性脑损伤具有明显的保护作用。

关键词 核磁共振;魔角旋转;模式识别;脑缺血;当归

中图分类号:R49,R743,R285 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0879-04

Effects of angelica on metabolites in cerebral ischemia rats/CHEN WENXUE,LIAO WEIJING,LIU HUA,et al./// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(10):879—882

Abstract Objective: To study the effect of angelica on metabolites in cerebral ischemia rats by high-resolution magic angle spinning HRMAS ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Method:** 18 male Wistar rats, weighing 150—200g, were randomly divided into four groups such as normal (n=6), ischemia (n=6), Angelica treatment (n=6). The rat ischemia model was established by middle cerebral artery occlusion(MCAO) method, resuming blood or drug treatment after 3 hours ischemia. The metabolites changes of rat cerebra and cerebella was observed with ¹H HRMAS NMR technology, including N-acetyl-aspartate(NAA), creatine(Cre), choline(Cho), glycine(Gly), glutamate(Glu), aspartate (Asp) and taurine (Tau) etc. **Result:** Excluding Cho, Glu, Asp, the concentrations of most metabolites of rat brain during ischemia were significantly lower than these of normal rats, and could be increased after drug treatment. **Conclusion:** Angelica shows positive effect on metabolites in cerebral ischemia rats.

Author's address State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic Molecular and Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071

Key words nuclear magnetic resonance spectroscopy; magic angle spinning; pattern recognition; ischemia; angelica

目前核磁共振技术研究大鼠脑缺血主要集中在磁共振成像领域,包括T1、T2加权像、功能成像(functional MR Imaging,fMRI)以及分子影像学(molecular MR Imaging)等,而用活体定域波谱(magnetic resonance spectroscopy,MRS)来研究大鼠脑缺血常因较低的图谱分辨率使其应用受到一定的限制^[1]。本文主要利用近年来出现的高分辨魔角旋转核磁共振(high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy,¹H HR MAS NMR)技术^[2],研究当归对大鼠脑缺血性脑损伤代谢物质的影响,目的是观察大鼠脑组织中多种代谢物,如胆碱(choline,Cho)、肌酸(creatine,Cre)、N-乙酰天门冬氨酸(N-acetylaspartate,NAA)、γ-氨基丁酸(gamma aminobutyric acid,GABA)、谷氨酸(glutamate,Glu)、谷氨酰胺(glutamine,Gln)、肌醇(myo-inositol,Ino)、天门冬氨酸(aspartate,Asp)、甘氨酸(glycine,Gly)等峰的变化,旨在阐明当归对代

谢物变化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

600MHz超导磁共振波谱仪(INVOA-600,Vari-an公司)

1.2 动物分组及造模

150—200g成年雄性Wistar大鼠18只(清洁级),华中科技大学同济医学院动物房。18只雄性

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(10234070, 20573132)

1 中国科学院武汉物理与数学研究所,波谱与原子分子物理国家重点实验室,湖北武汉,430071

2 中国科学院研究生院

3 武汉大学中南医院

4 通讯作者:邓风(中国科学院武汉物理与数学研究所,波谱与原子分子物理国家重点实验室,湖北武汉,430071)

作者简介:陈文学,男,博士

收稿日期:2006-01-26

Wistar 大鼠, 随机分成正常对照组($n=6$)、缺血组($n=6$)、当归治疗组 ($n=6$)。采用大脑中动脉阻断法(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 制作大鼠急性脑缺血损伤模型。首先, 动物麻醉, 腹腔注射乌来糖(每公斤体重注射 1g), 将尼龙线沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大脑中动脉起始部, 造成大脑中动脉血供阻断(MCAO)。栓线的头端加热成球形(直径 0.21—0.27mm), 缺血 3h 后, 退拔栓线, 恢复大脑中动脉的血供。未经治疗的缺血组(简称缺血组) 72h 后直接处死; 当归治疗组则是拔栓时给药, 72h 后再处死取材。

1.3 样品制备

样品的收集方法是直接断头取脑, 样品用量为 15—30mg 之间, 取出的大脑先经过液氮速冻, 然后保存在-85°C 低温冰箱中。

1.4 ^1H HR MAS NMR 检测

实验时将样品从低温冰箱中取出, 先用 0.9% D_2O 的生理盐水漂洗, 再装入 4mm 的 NMR 转子。采用 Varian INVOA-600 谱仪, 在常温条件下(约 25°C) 进行测定, 转子的转速 $\text{Vr}=2\text{kHz}$, 谱宽 $\text{SW}=12\text{kHz}$, 累加次数 $\text{NT}=128$ 次, 采样数据点 $\text{NP}=16\text{k}$, 采样延迟 $\text{D1}=2.0\text{s}$, 采样时间 $\text{AT}=0.667\text{s}$, 采用的脉冲序列是单脉冲和 CPMG 序列(回波时间 $\text{TE}=32\text{ms}$), 同时用预饱和序列压水峰, 每个样品的测试总时间不超过 20min。

1.5 波谱处理

采集到的数据(FID)通过 FFT 变换, 对于单脉冲和 CPMG 序列处理的窗函数(lb) 分别为 0.3 和 1.0, 所有的数据再用 XWINNMR(Bruker, Germany) 软件系统进行自动相位和基线校正处理, 然后用乳酸双峰(Lac: $\delta\text{H } 1.32-1.34\text{ppm}$)的化学位移值作为内标进行定标, 分别得到不同的高分辨魔角旋转波谱。

1.6 主成分分析

主成分分析法(principal components analysis, PCA), 是通常对一维 ^1H HR MAS NMR 谱简化的主要方法, 它是指在保持数据损失最少的原则下, 对高维变量空间进行降维处理的一种线性映射方法^[3]。将上述 3 组大鼠各自 CPMG 序列的波谱进行主成分分析, 选取的积分区间是 $\delta\text{H } 0.52-4.52\text{ppm}$, 将整个谱分成了 100 段, 而每一段积分是 0.04 ppm, 然后将所有样品的积分值进行归一化, 最后用 SIMCA-P 10.0 软件进行主成分分析。

1.7 统计学分析

从上述归一化后的 100 段积分值中选取出现 9

种代谢物(包括 mI、Cre、Gly、Cho、Asp、Glu、Gln、NAA、GABA) 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 9 个总积分值, 在统计分析中就用这 9 个总积分值来分别表示 9 种代谢物的含量大小, 然后用单向方差分析方法(One-way ANOVA, SPSS10.0 软件)对它们进行分析。

2 结果

2.1 ^1H HR MAS NMR 分析

2.1.1 右侧大脑的 ^1H HR MAS NMR 分析: 18 只 Wistar 雄性大鼠随机分成 3 组, 缺血组和治疗组的缺血时间为 3h, 其高分辨魔角旋转波谱如图 1 所示。其相关的代谢物见表 1。图 1 显示, 右大脑缺血 3h 其波谱中很多种代谢物发生了显著的变化, 如 Cre、GABA、Gly 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; 而与脑缺血程度紧密相关的代谢物 Cho、Glu、Asp、Lac 的含量增加。

表 1 脑组织中各主要代谢物的归属

简称	英文全称	中文名称	化学位移(ppm)
Lip	lipid acid	脂肪酸	0.87, 1.29, 1.59, 2.03, 2.23, 2.80, 5.30
Lac	lactate	乳酸	1.33, 4.12
Ala	alanine	丙氨酸	1.48, 3.79
Ace	acetate	乙酸	1.91
GABA	gamma aminobutyric acid	γ -氨基丁酸	1.91, 2.30, 3.02
NAA	N-acetyl aspartate	N-乙酰天门冬氨酸	2.03, 2.51, 2.70, 4.40
Glu	glutamate	谷氨酸	2.07, 2.36, 3.77
Gln	glutamine	谷氨酰胺	2.14, 2.46, 3.77
Asp	aspartate	天门冬氨酸	2.68, 2.82
Cre	creatine	肌酸	3.04, 3.93
PCr	phosphocreatine	磷酸肌酸	3.04, 3.93
Cho	choline	胆碱	3.19, 3.52, 4.07
PC	phosphorylcholine	磷酸胆碱	3.21, 3.52, 4.07
Tau	taurine	牛磺酸	3.25, 3.43
Gly	glycine	甘氨酸	3.57
Ino	myo-inositol	肌醇	3.28, 3.56, 3.63, 4.06

图 1 大脑右侧缺血 3h 的高分辨魔角旋转氢谱

2.1.2 缺血脑组织邻近部位的¹H HR MAS NMR 分析:大鼠左侧大脑和相应的右侧小脑也出现与右侧大脑类似情况,其波谱中 Cre、NAA、GABA、Gly 等多种代谢物含量降低,如图 2 所示。

2.2 当归治疗后的¹H HR MAS NMR 分析

治疗组¹H HR MAS NMR 谱如图 3 所示,其代谢物 NAA、GABA、Gly 含量均有一定回升,提示当归已明显改善了大鼠实验性急性脑缺血症状。

2.3 波谱的主成分分析

将所有大脑右侧的高分辨魔角旋转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结果分析图(PCA),图中每一个点分别代表一个测试样品。PCA 图明显可分为二个区域:t1 组右下角所在区域为一组(缺血组),左边所在区域为一组(正常对照组),经当归治疗后,6 只大鼠中有 5 只回到对照组区域。这说明当归对大鼠缺血性脑损伤具有一定的保护作用。图 5 是与 PCA 对应的第一、二主成分的

Loading 图,图中 p1、p2 对应的值,如 1.34, 2.02, 3.02, 3.22 分别表示 Lac、NAA、Cre、Cho 等峰的化学位移值,其值越大说明此代谢物在脑缺血过程中影响最大。

2.4 代谢物的含量变化

表 2 表示大鼠大脑右侧中 9 种代谢物峰的积分均值,标准偏差和 P 值。用单向方差分析方法分析可知正常对照组与缺血组之间有三种代谢物(Cho, Glu, NAA)具有显著性差别($P < 0.05$),如神经元代谢的标志物 NAA 的含量在正常状况时其值为 8.38 ± 0.75 ,发生急性缺血时则降为 5.89 ± 0.48 ,但经当归治疗后其值会升高到 6.57 ± 1.1 。

图 6 提示急性缺血时脑中 Cre、Gly、NAA、GABA 四种代谢物的含量出现下降,而 Ino、Cho、Glu、Gln、Asp 等五种代谢物的含量则处于上升;当归治疗后,原来下降的代谢物会出现一定程度的上升,而原来上升的则降低。

表 2 大鼠大脑中各代谢物峰的均值,标准偏差和 P 值

代谢物	代谢物峰均值 \pm 标准偏差(10^{-3})			显著性差别(P)	
	对照组	缺血组	当归组	对照组-缺血组	对照组-当归组
Ino	7.68 \pm 0.87	7.93 \pm 0.38	6.70 \pm 1.11	0.959	0.261
Cre	8.35 \pm 0.70	7.81 \pm 0.59	8.26 \pm 1.30	0.819	0.999
Gly	1.59 \pm 0.16	1.37 \pm 0.17	1.38 \pm 0.11	0.227	0.236
Cho	0.89 \pm 0.16	1.62 \pm 0.17	1.01 \pm 0.19	0	0.761
Asp	0.97 \pm 0.11	1.34 \pm 0.24	1.11 \pm 0.22	0.064	0.732
Glu	2.84 \pm 0.21	3.84 \pm 0.44	3.31 \pm 0.43	0.008	0.348
Gln	2.19 \pm 0.19	2.62 \pm 0.28	2.49 \pm 0.19	0.096	0.355
NAA	8.38 \pm 0.75	5.89 \pm 0.48	6.57 \pm 1.15	0.001	0.065
GABA	5.78 \pm 1.10	4.35 \pm 0.38	5.00 \pm 0.90	0.064	0.487

图 2 右侧小脑缺血 3h 的高分辨魔角旋转氢谱

图 3 a 正常对照组大脑右侧氢谱;b 缺血组大脑右侧氢谱;c 当归治疗组大脑右侧氢谱

* * * * *

对照组(■);缺血组(*);当归治疗组(▲)

图 4 大鼠波谱中第一和第二主成分的结果分析图

图 5 与 PCA 对应的第一、二主成分的 Loading 图

图6 大脑中代谢物的均值对照

3 讨论

采用高分辨魔角旋转波谱技术来研究大鼠脑缺血模型,能检测到脑中十几种代谢物的变化,得到活体磁共振看不到的许多氨基酸的信息。通过主成分分析和统计学处理,我们发现大鼠急性脑缺血时,脑中有多种代谢物会发生变化,特别是与神经元相关的NAA,兴奋性氨基酸Glu,胆碱Cho以及与能量相关的Cre的变化尤为明显,因此可以通过观察这些代谢物的变化来研究当归对大鼠急性缺血性脑损伤的影响。NAA仅存在于神经组织,是神经元代谢的标志物,其强度或积分值的减小可反映神经元死亡和功能受损的状况;Cho是细胞膜脂质的组成成分,反映细胞膜的合成与髓鞘的降解;Cre是能量代谢分子,其含量的多少反映细胞的能量平衡;Glu、Asp是兴奋性氨基酸,它们的释放可产生神经毒性作用;而GABA和Gly是抑制性氨基酸,能抑制神经兴奋,对神经毒性起一定的保护作用。通常情况下,兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸是处于一个动态平衡之中,如果检测到Glu、Asp含量下降,意味着大脑中抑制性氨基酸的含量会增加,从而对抑制大脑兴奋具有一定的保护作用^[4-7]。

最近的研究发现大脑发生急性缺血时,其远隔部位(如小脑)也会出现相应的变化(血流量下降),表现为远隔功能抑制或神经机能联系不能,提示大鼠脑缺血严重影响着大、小脑神经元的存活和物质代谢,小脑的功能也会因MCAO而有部分受损。我们的结果与上述研究基本一致^[8-9]。这说明大鼠脑侧及远隔组织之间存在着一定的神经功能联系。

本研究显示大鼠发生急性脑缺血时大鼠神经元功能受损,细胞膜受损以及细胞的能量平衡受到破坏(NAA、Cre下降,Cho上升),同时产生神经兴奋毒性(Glu、Asp上升),然经当归治疗后,其NAA、Cre

含量的上升和Cho的下降提示先前的损伤会有一定程度的改善,另一方面,治疗后Glu、Asp的下降则会导致GABA和Gly的上升,明显改善大鼠急性脑缺血症状,从而对缺血性脑损伤起到一定的保护作用。

当归是临床使用多年的活血化瘀药,具有降低血小板聚集、改善血液流变学及抗血栓形成等作用,对离体和在体神经元具有直接的保护作用。本文从研究脑代谢物质变化入手,揭示当归治疗对缺血性脑损伤脑代谢物质的变化产生显著影响,为临床治疗提供了有力的证据。

参考文献

- [1] Lei H, Zhang Y, Chen W, et al. Changes in the proton T2 relaxation times of cerebral water and metabolites during forebrain ischemia in rat at 9.4 T [J]. Magn Reson Med, 2003, 49 (6): 979.
- [2] Water J, Nicholson JK, Garrod S, et al. High-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition [J]. Analytical Biochemistry, 2000, 282(1):16.
- [3] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and application in biomedical magnetic resonance[J]. Progress in NMR spectroscopy, 2000, 39(1):1.
- [4] Bo H, Shenggang S, Guangwu M, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract on rats during cerebral ischemia/reperfusion[J]. Chinese Medical Journal, 2002, 115(9): 1316.
- [5] Yi L, Zhang S, Zhang X. An experimental proton magnetic resonance spectroscopy analysis on early stage of acute focal cerebral ischemia [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2002, 22(4): 359.
- [6] Liao WJ, Yang YH, Liu ML, et al. The effects of Erigeron breviscapus preparation on the imaging and neuronal metabolites at the early time points after reperfusion following the ischemic cerebral injury in rats [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2003, 28 (2):163.
- [7] Peng H, Li YF, Sun SG. Effects of Ginkgo biloba extract on acute cerebral ischemia in rats analyzed by magnetic resonance spectroscopy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(5):467.
- [8] Sertese M, Yzben T, Gumuslu S, et al. Biochemical evidence of crossed cerebellar diaschisis in terms of nitric oxide indicators and lipid peroxidation products in rats during focal cerebral ischemia[J]. Acta Neurol Scand, 2001, 103(1):43.
- [9] Gold L, Lauritzen M. Neuronal deactivation explains decreased cerebellar blood flow in response to focal cerebral ischemia or suppressed neocortical function [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11):7699.