

氨基酸代谢与缺血性脑中风的相关性研究

万小莉^{1,2}, 夏鑫华², 戚欢阳³, 刘梅⁴, 张春风¹, 张大鹏² (1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198; 2. 广州医科大学附属第一医院, 广东 广州 510120; 3. 中科院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 4. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 利用基于氯甲酸乙酯衍生化反应的气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)的代谢组学测定方法, 测定正常组、假手术组和模型组大鼠脑组织中 18 种氨基酸的含量, 利用主成分分析方法 (PCA) 分析脑内氨基酸代谢与缺血性脑中风的相关性, 从代谢组学角度初步揭示缺血性脑中风潜在的生物标志物。 **方法** 通过氯甲酸乙酯化反应, 将生物样品中的氨基酸、脂肪酸、有机酸、糖类和固醇类物质制成热稳定性强、易挥发的酯或醚, 通过优化色谱条件对大鼠脑组织中 18 种氨基酸含量进行分析测定。 **结果** 利用已建立的 GC-MS 测定方法, 测定大鼠脑组织中 18 种氨基酸的含量, 并通过主成分分析方法比较了正常组、假手术组和模型组之间的差异。 **结论** 初步发现了 13 种与缺血性脑中风密切相关的氨基酸类生物标志物, 13 种化合物分别为丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸和色氨酸。

关键词: 氨基酸代谢; GC-MS; 缺血性脑中风; 代谢组学; 生物标志物

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0588-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.016

Relationship Between Metabolism of Amino Acids and Ischemic Cerebral Stroke in Rats

WAN Xiaoli^{1,2}, XIA Xinhua², QI Huanyang³, LIU Mei⁴, ZHANG Chunfeng¹, ZHANG Dapeng² (1. School of Chinese Herbal Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198 Jiangsu, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 3. Lanzhou Institute of Chemical Physics, China Academy of Sciences, Lanzhou 73000 Gansu, China; 4. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective A metabolomics method based on derivation reaction combined with gas chromatography-mass spectrometry was established to investigate 18 amino acids of the endogenous metabolites from the brains of normal rats and modeled rats. The present study was performed to find out the potential biomarkers after analyzing the relationship between metabolism of amino acids and ischemic cerebral stroke in rats by the methods of principal component analysis (PCA). **Methods** Amino acids, fatty acids, organic acids, glucose and sterols were transferred into ethers or esters which were heat-stable and highly volatile through silylation derivation reaction. And then the chromatographic conditions were optimized to analyze the cerebral endogenous metabolites of the rats. **Results** The metabolic fingerprints of the endogenous metabolites were obtained by the optimal method reported in another article. Data of 18 amino acids in the rat brain of normal rats, sham operation rats and model rats was analyzed by PCA. **Conclusion** Thirteen potential biomarkers of ischemic stroke have found out and they were alanine, glycine, valine, glutamic acid, leucine, proline, aspartic acid, phenylalanine, cysteine, lysine, histidine, tyrosine, and tryptophane.

Keywords: Amino acids; GC-MS; Ischemic cerebral stroke; Metabolomics; Biomarker

收稿日期: 2013-05-25

作者简介: 万小莉, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分的代谢和代谢组学的研究。Email: mayliu2004@163.com。通讯作者: 夏鑫华, 男, 博士, 副教授, 主要从事中医心脑血管疾病的代谢组学研究。Email: star1124@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81373628); 广东省科技攻关项目(2012B031800239); 广州市属高校科研计划项目(2012C075); 广州市科技计划项目(201300000141)。

代谢组学作为一门新发展的技术,是通过考察生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化,来研究生物体系代谢途径的一种技术^[1]。代谢组学技术应用于药物作用机制的研究,其基本原理是病理状态破坏正常细胞的结构功能,改变细胞代谢途径中内源性代谢物的稳态,从而通过直接或间接效应改变流经靶组织的血浆成分。因此,体内某种生物分子或代谢物的动态变化可以作为病理性损伤的标志物^[2]。氨基酸类代谢物组在脑组织内的异常升高或降低,会对脑组织产生毒性作用,已经是公认的脑中风损伤机制之一^[3-4]。因此,本研究以脑组织中内源性氨基酸代谢物为目标,利用代谢组学技术研究缺血性脑中风(Ischemia Stroke, IS)模型大鼠脑组织内源性氨基酸的代谢,寻找可以预示缺血性脑损伤的生物标志物,为中医药治疗心脑血管疾病提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 6890N/5973N 气相色谱-质谱联用仪,配有 Agilent G4513A 自动进样器,Agilent DB-5MS 毛细管柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm),Agilent 色谱工作站和 NIST2008 质谱数据库。

1.2 试剂 18 种氨基酸(分析纯),均购自上海中泰化学试剂有限公司;98% 氯甲酸乙酯(ECF),上海三友试剂厂;无水乙醇,利安隆博华医药化学有限公司;吡啶,汕头市西陇化工厂有限公司;氯仿,天津化学试剂有限公司;超纯水器,上海涑科仪器有限公司。

1.3 动物 成年 SD 大鼠 18 只,SPF 级,雄性,体重 200~250 g,购于广东省实验动物中心,动物合格证号:SCXY-粤-2003-0001,自由摄食,饮水。

1.4 分组、造模与给药 大鼠饲养 7 d 后,随机分为 3 组,每组 6 只,即正常组、假手术组和模型组。采用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型(middle cerebral artery occlusion model, MCAO),术前禁食 12 h,自由饮水。手术前按 3.5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,保留自主呼吸,仰卧位固定,术中体温由肛温计监测,并维持肛温在 37℃。取大鼠腹侧颈部正中作为手术切口,沿胸锁乳突肌内缘肌肉、筋膜分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼腭动脉,分离过程中电凝血管小分支及交通支以防出血。结扎右侧翼腭动脉,在距右颈总动脉分叉约 1 cm 处结扎右颈外动脉,于远心端用电凝器将其灼断。动脉夹夹闭右颈总动脉、颈内动脉,在右颈外动脉距结扎处近心

端约 0.5 cm 处刺一小切口,牵拉右颈外动脉残端,使其与右颈内动脉成一直线,将线栓经切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进并松开右颈内动脉处动脉夹。以颈总动脉分叉处为标记,推进 18~20 mm 感到轻微阻力时,即已阻断大脑中动脉血流。阻断 2 h 后,拔出线栓恢复血流再灌注,缝合皮下组织和皮肤,完成模型。假手术组除不插线栓外,全过程同模型组。

1.5 取样 正常组直接放入代谢笼,麻醉致死后取脑,其余组分别于缺血 2 h 再灌注 24 h 后处死大鼠,取全脑。将全脑组织加入 9 倍体积(*v/m*)生理盐水,匀浆,后置于-20℃冰箱中保存。

1.6 样品的制备方法 精密称定相应的氨基酸标准品,分别置于 100 mL 容量瓶中,加入 0.05 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶解制成浓度约为 2 mg·mL⁻¹ 的标准品储备溶液。分别吸取各氨基酸储备溶液各 50 μL 制成 100 μg·mL⁻¹ 的混合标准品溶液,再用 0.05 mol·L⁻¹ HCl 逐级稀释制成 10, 5, 3, 1, 0.8, 0.5, 0.2 μg·mL⁻¹ 标准品溶液,用于标准曲线的绘制。

脑组织匀浆解冻后取 1.6 g,加入纯水 3.2 mL,室温下超声(80 Hz)提取 30 min,离心 10 min(4500 r·min⁻¹),取出上清液,沉淀重复提取 1 次,合并上清液,于 50℃ 下真空干燥,加入 0.05 mol·L⁻¹ HCl 200 μL、无水乙醇 200 μL、吡啶 50 μL 及 ECF 50 μL,反应后加入氯仿 600 μL 萃取,氯仿层进样 GC-MS 分析。

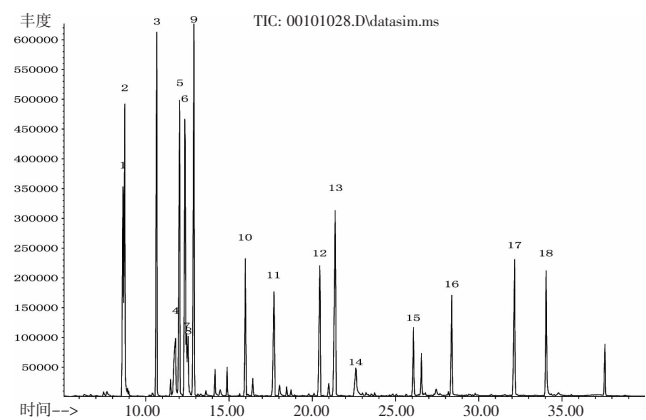
1.7 GC-MS 分析条件 进样量:1 μL,进样口温度:270℃,载气:高纯氦气(99.9996%),流量:1.1 mL/min,不分流进样,升温程序:80℃(保持 2 min),10℃/min 升至 140℃,4℃/min 升至 240℃,10℃/min 升至 280℃(保持 3 min),离子源温度:230℃,电压:70 eV,四级杆温度:150℃,扫描方式:全扫描,检测质荷比范围 50~550 *m/z*,溶剂延迟:5 min。

1.8 数据处理方法 数据处理采用 SIMCA-P 11.0 (Umetrics, Umea, 瑞典)软件进行主成分分析(PCA)。

2 结果

2.1 氨基酸的色谱分离 通过氯甲酸乙酯的衍生化、GC-MS 的分离测定,18 种氨基酸标准品和不同组大鼠大脑组织样品的色谱图见图 1 和图 2,从色谱图中可以看出 18 种氨基酸分离良好,在大鼠脑组织中均能同时检测到这 18 种氨基酸,其保留时间、主要离子碎片见表 1。

2.2 方法学验证 18 种氨基酸在线性范围内具有良好



1. 丙氨酸(Ala); 2. 甘氨酸(gly); 3. 缬氨酸(Val); 4. 谷氨酸(Glu); 5. 亮氨酸(Leu); 6. 异亮氨酸(Iso); 7. 丝氨酸(Ser); 8. 苏氨酸(Thr); 9. 脯氨酸(Pro); 10. 天冬氨酸(Asp); 11. 甲硫氨酸(Met); 12. 苯丙氨酸(Phe); 13. 半胱氨酸(Cys); 14. 谷氨酰胺(Gln); 15. 鸟氨酸(Orn); 16. 赖氨酸(Lys); 17. 酪氨酸(Tyr); 18. 色氨酸(Trp)

图1 18种氨基酸衍生物 GC-MS 选择离子流图
Figure 1 The SIM chromatogram of derivations of 18 amino acids detected by GC-MS

表1 18种氨基酸衍生物的保留时间及碎片特征
Table 1 The retention time and MS fragments of derivations of 18 amino acids

氨基酸	分子量	保留时间/min	EI 质谱碎片(m/z)
丙氨酸	89	8.592	116, 88, 72
甘氨酸	75		102, 73, 204
缬氨酸	117	10.618	144, 72, 55, 116
谷氨酸	147	11.611	84, 56
亮氨酸	131	11.987	158, 102
异亮氨酸	131	11.988	158, 102, 74, 130
丝氨酸	105	12.315	132, 65, 74, 101, 175
苏氨酸	119	12.316	129, 101, 74, 56, 175
脯氨酸	115	12.841	142, 70, 98, 114
天冬氨酸	133	15.969	188, 56, 70, 116
甲硫氨酸	149	17.653	61, 101, 129, 175
苯丙氨酸	165	20.403	176, 91, 191, 102, 120,
半胱氨酸	121	21.311	220, 102, 74, 56, 132
谷氨酰胺	146	22.536	84, 128, 173, 56
鸟氨酸	132	26.038	142, 70, 258
赖氨酸	146	28.335	156, 56, 84, 128
酪氨酸	181	32.087	107, 192, 264, 135, 280
色氨酸	204	34.045	130, 304

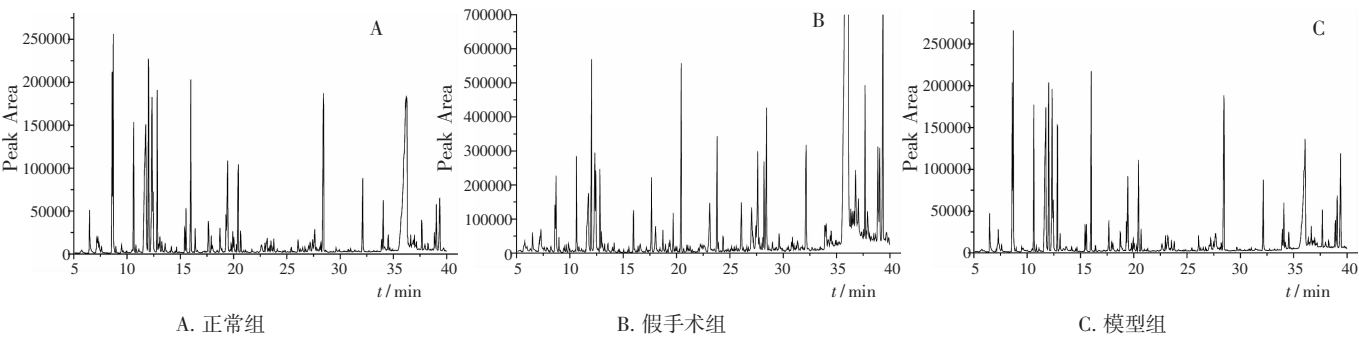


图2 不同组大鼠脑组织 GC-MS 选择离子流图
Figure 2 The SIM chromatograms of derivations of amino acids in rats brains from different groups

的线性关系,其相关系数 R^2 在0.9927~1之间,精密度RSD值在5.64%以内,重复性RSD值均低于9.30%,稳定性RSD值均低于15%,加样回收率在70%~120%之间。说明建立的衍生化和GC-MS法精密、准确,适用于脑组织中氨基酸的含量测定。

2.3 氨基酸含量测定结果 按上述方法测定正常组、假手术组、模型组大鼠脑组织中18种氨基酸的含量,结果见表2。

2.4 主成分分析 将正常组、假手术组和缺血模型组的18种氨基酸含量做PCA分析,以18种氨基酸含量X为变量,得到如图3所示的结果。在PCA模型中,正常组样本、假手术组样本和模型组样本分别聚集在不同区域,分离度良好,模型分别解释了74%

和46%的原始数据,说明造模前后大鼠脑组织内的氨基酸浓度发生了显著的变化。如图3所示,在散点图中正常组和假手术组样本数据集中符合分组要求,模型组虽然数据较为离散,但都跟正常组分开,而且其矢量方向一致(正常组分布在二维空间左侧,模型组均分布在右侧),表明MCAO模型对氨基酸的影响模式相似,均可造成缺血性脑损伤。如图4所示,18种氨基酸散点的矢量方向基本一致,除Asp和Glu居于PCA模型下方(负方向),其余氨基酸都居于PCA模型上方(正方向),提示这两种矢量方向在脑损伤中可能发挥不同的作用。处于正矢量方向的Lys、Ile、Ala和Gly氨基酸离散程度比较大,其他的氨基酸都聚集在一起,提示这两类氨基酸对脑损伤的程度贡献不同。

表 2 正常组、假手术组、模型组大鼠脑组织中 18 种氨基酸的含量测定结果($n=3$)

Table 2 The quantitative contents of 18 amino acid in rats brains from vehicle control group, slam group and MCAO group

AAs	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
	正常组	假手术组	模型组
丙氨酸	21.06±1.94	21.56±2.85	28.15±2.07*
甘氨酸	46.81±4.32	47.90±6.34	62.65±4.61*
缬氨酸	12.72±1.51	14.12±3.11	20.78±1.40*
谷氨酸	107.63±2.12	107.43±24.88	145.56±23.91*
亮氨酸	29.12±5.63	33.21±3.55	40.27±0.68*
异亮氨酸	56.78±3.42	61.74±8.57	81.78±9.37*
丝氨酸	5.77±2.03	7.89±1.32	6.02±1.44
苏氨酸	6.75±1.92	7.48±1.04	7.08±0.91
脯氨酸	14.38±0.51	17.48±4.60	22.29±3.16*
天冬氨酸	25.05±4.25	31.02±14.01	52.01±19.37*
甲硫氨酸	6.85±1.83	7.91±0.84	6.38±0.63
苯丙氨酸	26.77±4.91	30.65±3.16	40.26±5.76*
半胱氨酸	22.18±3.87	25.64±3.77	45.31±4.95*
谷氨酰胺	11.30±1.44	11.23±1.04	8.66±1.85
鸟氨酸	7.97±0.37	18.34±15.86	9.49±1.79
赖氨酸	57.48±8.95	69.06±17.22	88.46±12.73*
酪氨酸	19.81±4.81	27.90±7.11	30.67±4.20*
色氨酸	15.33±2.34	14.12±1.47	20.80±2.04*

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ 。

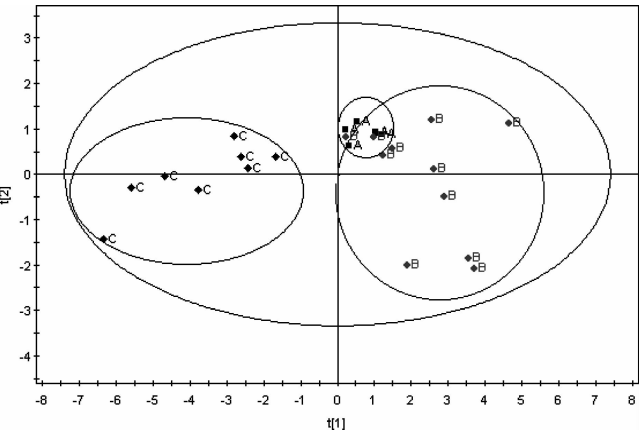


图 3 正常组(A)、假手术组(B)、模型组(C)大鼠脑组织中氨基酸代谢模式 PCA-DA 示意图

Figure 3 The PCA plotting of amino acids in rats' brains from group(A), sham group(B) and MCAO group(C)

注：模型参数 $R^2X(\text{cum})=0.743$, $R^2Y(\text{cum})=0.476$, $Q^2(\text{cum})=0.363$ 。

3 讨论

大脑缺血缺氧后造成脑组织器质性损伤的同时，也影响了其生化代谢功能，造成脑组织生化代谢的异常，表现为代谢物组(氨基酸类、脂肪酸类和脂质)的异常波动(含量增加或降低)，即出现应激能量代谢

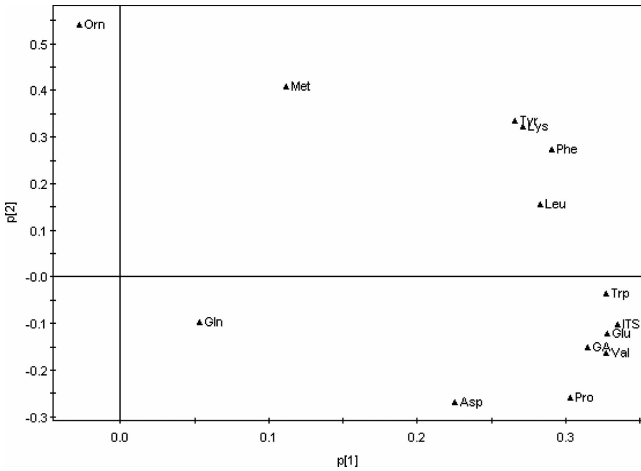


图 4 假手术组、模型组大鼠脑组织氨基酸 PCA 聚类载荷图
Figure 4 The PCA coading plots of 18 amino acids in rats' brains from sham group and MCAO group

障碍，脑中风会引起能量代谢异常，同时能量代谢异常也会导致脑中风，缺血性脑中风过程中存在着代谢紊乱，能量消耗增加的高分解代谢状态和对代谢底物利用的改变，从代谢物组学角度体现为脑组织中某些代谢物的含量降低和某些代谢物的含量增加，这些改变共同构成了缺血性脑中风的代谢特征。在临床上，高血脂、高糖和高胆固醇是缺血性脑中风患者的共同特征，当脑中风发生时，脑组织水肿、炎症、神经元损伤、梗死等均可引起代谢物组的明显改变，特别是脑组织中游离氨基酸代谢的改变，而兴奋性氨基酸的异常积聚加重脑组织的损伤，加剧代谢紊乱。因此，以代谢组学技术发现这些异常代谢物组，揭示与缺血性脑中风密切相关的生物标志物，无疑将对脑中风的诊断、治疗和药物的筛选提供直接、客观、科学的依据。氨基酸广泛存在于动、植物当中，生理状态下，氨基酸在人体血浆中的浓度很低，若血浆中出现高浓度的氨基酸，人体将会产生一系列的病理生理改变。兴奋性氨基酸有很强的细胞毒性，可损害细胞膜、线粒体和溶酶体膜等，引起细胞内微器的损害，而且能增强细胞因子毒性，在许多疾病的病理生理中起到重要的作用。研究表明，神经元释放的多种氨基酸对缺血性脑损伤也起重要作用。在这些氨基酸中，除兴奋性氨基酸-谷氨酸(glutamic acid, Glu)发挥着重要作用之外^[5]，甘氨酸(Glycine, Gly)和 γ -氨基丁酸(GABA)也对脑缺血损伤有明显影响。Onley 于 1969 年首先提出 Glu 对神经元有很强的兴奋毒性作用。这一观点随后得到一系列研究的证实^[6]。研究^[7-8]证实，兴奋性氨基酸在神经元缺血性损伤中起着重要的作用。随着 IS 发病率的逐年增高，寻找有效防治该病的措施，已

成为世界研究的热点之一。中医药对 IS 的治疗具有一定的优势,其药理作用的多靶点、多途径性引起了医学界的广泛重视。本研究利用代谢组学技术研究了缺血性脑中风大鼠脑组织内的氨基酸代谢规律,发现了 13 种潜在的生物标志物,将对中医药预防、诊断和治疗缺血性脑中风疾病提供新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Liu CX, Li C, Lin DH, et al. Significance of metabonomics in drug discovery and development[J]. Asian J Drug Metab Pharmacok, 2004, 4(2): 87-96.
- [2] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 153-161.
- [3] Gomi S, Karp AH. Regional alterations in an excitatory amino acid transporter, blood flow, and glucose metabolism after middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Exp Brain Res, 2000, 130(4): 521-528.
- [4] Jabaudon D, Scanziani M, Gahwiler BI, et al. Acute decrease in net glutamate intake during energy deprivation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(7): 5610-5615.
- [5] Giuffrida R, Malation LS, Bellomo M, et al. Immunohistochemical modifications of vasoactive neuropeptides and excitatory amino acids in the nervous tissue of the Mongolian gerbil after transient cerebral ischemia[J]. Int J Dev Neurosci, 1999, 17(2): 99-107.
- [6] Furukawa N. Endogenously released DOPA is a causal factor for glutamate release and resultant delayed neuronal cell death by transient ischemia in rat striata[J]. J Neurochem, 2001, 76(3): 815-824.
- [7] Skvortsova VI, Raevskii KS. Levels of neurotransmitter amino acids in the cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic insult [J]. Neurosci Behav Physiol, 2000, 30(5): 491-495.
- [8] Scheller D, Szathmary S, Kolb J, et al. Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression, during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct[J]. Amino Acids, 2000, 19(324): 571-583.

(编辑: 宋威)

(上接第 557 页)

本研究显示,慢性心理应激能够升高 T2DM 小鼠血清中的 TG、CHO,降低 HDL-C,但却使小鼠的体质质量相对减轻;加味逍遥散能直接降低 T2DM 小鼠血清中的 TG、CHO、LDL-C,升高 HDL-C,并且减轻应激刺激对小鼠血脂及体质量的影响。其作用机制可能是通过提高胰岛素的敏感性以纠正 T2DM 小鼠紊乱的糖脂代谢状态。以往研究发现^[12],精神过度紧张人群的血脂中 TG 和 LDL-C 比正常对照者均升高,与职业有关的慢性应激可以使其血浆 CHO 升高,而急性应激则可导致血浆载脂蛋白 B 和 TG 升高,血浆中的 LDL-C 和纤维蛋白原升高。在应激状态下,高胆固醇血症可进一步损害血管内皮功能,而且这种损伤与应激的强度密切相关^[13]。

参考文献:

- [1] 李道本,王智明. 从肝论防治胰岛素抵抗治疗 2 型糖尿病的理论探讨[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(3): 153-156.
- [2] 王明选,旷云祥. “从肝论治”学说治疗糖尿病举隅[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(5): 117-119.
- [3] 韩乐兵,陶毅. 糖尿病从肝胆论治初探[J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(8): 611-612.
- [4] 刘绪银,石海澄,王笃高,等. 论肝与消渴[J]. 湖南中医药导报, 2000, 6(3): 13-14.
- [5] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview[J]. Indian Journal of Medical Research, 2007, 125(3): 451-472.
- [6] 敖海清,孙琪,富文俊,等. 逍遥散对慢性应激状态下大鼠海马神经细胞内糖皮质激素受体表达的影响[J]. 中医药学报, 2010, 38(5): 58-62.
- [7] 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656-660.
- [8] Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic[J]. Nature, 2001, 414: 782-780.
- [9] De Fronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance[J]. Am J Journal of Practical Diabetology, 1979, 237(3): 214-223.
- [10] Ravipat IG, Aronow WS, Ahn C, et al. Association of hemoglobin A1c level with the severity of coronary artery disease in patients with diabetes mellitus[J]. Am J Cardiol, 2006, 97(7): 968-969.
- [11] 王喜,郑华丽. 120 例糖尿病患者血脂血糖的监测与分析[J]. 中国医药科学, 2011, 1(12): 111-112.
- [12] McCann BS, Benjamin GA, Wilkinson CW, et al. Plasma lipid concentrations during episodic occupational stress[J]. Ann Behav Med, 1999, 21(2): 103-110.
- [13] Gottdiener JS, Kop WJ, Hausner E, et al. Effects of mental stress on flow-mediated brachial arterial dilation and influence of behavioral factors and hypercholesterolemia in subjects without cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2003, 92(6): 687-691.

(编辑: 邓响潮)