

• 药理与临床 •

基于 NMR 代谢组学研究脑脉通复方提取物对大鼠脑缺血再灌注模型的影响

陈曦¹, 杨永霞², 王淑美¹, 王战红¹, 苏智斌¹, 李建生³, 梁生旺^{1*}

1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药学院基础学院, 广东 广州 510006

3. 河南中医学院老年医学研究所, 河南 郑州 450008

摘要: 目的 从整体上阐明脑脉通复方提取物不同剂量对脑缺血再灌注大鼠模型的作用及相关机制, 以优选最佳剂量。方法 采用改进的大脑中动脉阻断法(MCAO)建立 Wistar 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 应用核磁共振技术(NMR)和主成分分析(PCA)方法分析给予大鼠脑脉通复方提取物(1.5、3.0、6.0 g/kg)后, 大鼠血浆代谢物变化, 并结合脑组织病理切片 HE 染色检测, 明确脑脉通复方提取物对脑缺血再灌注模型大鼠的治疗作用。结果 PCA 分析和 SPSS 统计结果显示, 脑脉通复方提取物中剂量(3.0 g/kg)能够很好地抑制 MCAO 引起的大鼠血浆中谷氨酰胺、牛磺酸、酪氨酸、乳酸升高; 提高脂类、胆固醇、3-羟基丁酸、N-乙酰天门冬氨酸、乙酰乙酸、谷氨酸、胆碱的水平, 使之趋向于正常。结论 脑脉通复方提取物中剂量能够很好地调节大鼠脑缺血再灌注后的代谢平衡, 从而起到抗脑缺血再灌注损伤的作用。

关键词: 脑脉通复方; 脑缺血再灌注损伤; 代谢组学; 核磁共振(NMR); 主成分分析(PCA)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0097-06

Study on effects of extract in Naomaitong Formula on cerebral ischemia-reperfusion model based on NMR metabolomics

CHEN Xi¹, YANG Yong-xia², WANG Shu-mei¹, WANG Zhan-hong¹, SU Zhi-bin¹, LI Jian-sheng³, LIANG Sheng-wang¹

1. College of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. College of Basic Studies, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3. Institute of Geriatrics, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

Abstract: **Objective:** To clarify the effects of the extract in Naomaitong Formula (ENF) at different doses on cerebral ischemia-reperfusion model of rats and its mechanism in order to optimize the dose group. **Methods** The focal cerebral ischemia-reperfusion model of Wistar rats was established by an improved middle cerebral artery occlusion (MCAO) method. NMR and principal component analysis (PCA) were applied to analyzing the changes of rat plasma metabolites by ig administration of ENF at 1.5, 3.0, and 6.0 g/kg. And the treatment of ENF for cerebral ischemia-reperfusion model of rats was testified by HE staining with rat brain tissue biopsy. **Results** PCA and SPSS analyses indicated that the ENF at middle dose of 3.0 g/kg could inhibit the increase of glutamine, taurine, tyrosine, and lactic acid in the plasma of rats, promote the level of lipid, cholesterol, trihydroxy-butyric acid, N-acetyl aspartic acid, acetacetic acid, glutamic acid, and choline, and make them tend to normal. **Conclusion** Middle dose of ENF could efficiently regulate the metabolic balance after cerebral ischemia-reperfusion injury of rats, so as to play a role of resisting the cerebral ischemia-reperfusion injury of rats.

Key words: Naomaitong Formula; cerebral ischemia-reperfusion injury; metabolomics; NMR; principal component analysis (PCA)

中医认为脑中风病可表现在“风”、“火”、“痰”、“虚”、“瘀”等多方面^[1]。现代医学认为脑中风是由血管及血流动力学变化引起脑动脉阻塞, 造成脑组织缺血、缺氧^[2-3]。脑脉通由葛根、川芎、三七等药

收稿日期: 2011-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81050019); 基于代谢组学融合多元信息识别技术的中药物质基础方法研究(81050019); 大黄有效部位用于缺血型脑中风的多元信息识别及血脑药代动力学研究(81073024); 大黄有效部位用于缺血型脑中风的多元信息识别(945102240)

作者简介: 陈曦(1987—), 女, 广东汕头人, 硕士研究生, 从事中药质量标准控制研究。Tel: (020)39352172 E-mail: chenxi870126@126.com

*通讯作者 梁生旺 Tel: (020)39352172 E-mail: swliang371@163.com

味组成,具有活血通脉、理气止痛之功效,主要用于心脑血管疾病的预防和治疗。该药物可以减轻脑缺血大鼠的神经症状、降低脑组织含水量、减小脑梗死面积,对脑缺血损伤具有保护作用^[4-6]。尽管已经证明脑脉通具有很好的临床疗效,但其药效物质基础还不甚清楚。

代谢组学是研究生命个体对外源性物质的刺激、环境变化或遗传修饰做出的所有代谢应答的全貌和动态变化过程的一门学科^[7],近年来已成为药学领域热点^[8-10]。Nicholson等^[11-12]提出利用核磁共振技术(NMR)和模式识别方法对生物体的体液和组织进行系统测量和分析,找出相关生物标志物。本实验应用NMR和主成分分析(PCA)方法,分析脑脉通对代谢网络的干预,同时进行病理观察,从整体上阐明脑脉通不同剂量对脑缺血再灌注动物模型的药效、作用机制,并优选最佳剂量,以建立适合中药复方疗效评价及物质基础的研究方法。

1 材料

1.1 动物

雄性Wistar大鼠,体质量(280±20)g,SPF级,河北医科大学提供,动物许可证号SKXK(冀)2008-1-003。

1.2 药品与试剂

人参、大黄、葛根、川芎均购自广州市致信中药饮片有限公司,药材由广东药学院中药学院李书渊教授鉴定,人参为五加科植物人参*Panax ginseng* C. A. Mey.的干燥根及根茎,大黄为蓼科植物药用大黄*Rheum officinale* Baill.的干燥根及根茎,葛根为豆科植物野葛*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi的干燥根茎,川芎为伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎。脑脉通提取物由本实验室制备:按照脑脉通组方配比称取葛根、川芎、人参、大黄适量,用10倍量60%乙醇于80℃水浴回流提取2次,每次60 min。45℃减压回收乙醇,浓缩至400 mL(脑脉通提取物中含蒽醌类成分≥75%)。尼莫地平片,广东华南药业有限公司,批号100903。

水合氯醛、红四氮唑(TTC),上海远帆助剂厂;肝素钠,陕西昕泰生物科技有限公司。

1.3 仪器

离心机、RE—52A型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DK—S26型电热恒温水浴锅,上海精密实验设备有限公司;SHZ—D III型循环水真空泵,巩义市予华仪器有限公司;Motic BA300光学显微

镜,麦克奥迪实业集团有限公司深圳分公司。

2 方法

2.1 分组与给药

84只大鼠随机分为6组,每组14只。造模前,假手术组和模型组ig给予生理盐水,尼莫地平阳性对照组ig给予尼莫地平片6 mg/kg,脑脉通高、中、低剂量组分别ig给予脑脉通复方提取物6.0、3.0、1.5 g/kg(以生药计),每日1次。动物自由饮水、饮食,连续给药4 d,第4天晚禁食不禁水,第5天手术前1 h给药。

2.2 脑缺血再灌注模型制备

除假手术组外,其他组均按照改进的大脑中动脉阻断法(MCAO)制备大鼠脑缺血再灌注模型^[13-14]。大鼠ip 1%水合氯醛40 mg/kg麻醉,仰卧位固定,颈正中切口,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),结扎ECA及CCA,在CCA分叉处剪一切口,将鱼线栓子经CCA和ICA进入到大脑中动脉起始部,阻断左侧大脑中动脉,鱼线栓子插入的深度为距ICA和ECA分叉处(18±0.5) mm,扎紧ICA处的备用线。假手术组只暴露左侧血管不做插线处理。术中、术后维持体温在37℃左右,缺血2 h后,拔出线栓2 mm,使血液再灌注。

2.3 血样采集与处理

再灌注6 h后,大鼠尾静脉取血2 mL置于1%肝素钠润洗过的EP管中,在4 000 r/min、4℃条件下,15 min内离心10 min,吸取上清液,转移至1 mL的EP管中,放入-80℃冰箱保存,备用。

2.4 脑组织病理学检查

大鼠取血之后迅速处死,完整取脑,立即放入-20℃低温冰箱中,冷冻15 min后,沿冠状面切成5片(第1刀在脑前极与视交叉连线中点处;第2刀在视交叉部位;第3刀在漏斗柄部位;第4刀在漏斗柄与后叶尾极之间)。取第2片脑切片,石蜡包埋,HE染色,光镜下(×400)观察脑组织以及神经细胞形态的变化。

2.5 代谢组学数据采集

取待测血样,常温解冻,300 μL血浆中加入100 μL D₂O、200 μL 磷酸缓冲液,于4℃、4 000 r/min离心5 min,取上清液500 μL转移至5 mm核磁管中。数据在Varian Unity Inova 500超导脉冲傅里叶变换NMR谱仪上采集。调用cpmg脉冲序列,设定如下参数:谱宽8 000 Hz,采样点数32 k,累加次数128次,弛豫延迟时间3 s,自旋回波时间100 ms。

傅里叶变换前加 0.3 Hz 窗函数处理,以乳酸(δ 1.33)为化学位移参考峰的位置。调用 MNOVA 中的程序将 $^1\text{H-NMR}$ 谱按 δ 0.04 化学位移间隔进行分段积分。将所产生的所有积分数据归一化,均以 Excel 文件格式保存,将上述得到的数据文件用 SIMCA-P10.0+统计软件进行主成分分析(PCA)。

2.6 数据处理

所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 17.0 统计软件处理,多样本之间组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 血浆中主要代谢物的 $^1\text{H-NMR}$ 归属

图 1 显示了各组大鼠血浆中主要代谢物的变化情况。可以看出,模型组中乳酸、丙氨酸、牛磺酸、

谷氨酰胺等的信号峰较假手术组、尼莫地平组和脑脉通中剂量组相应峰偏高,而脂类、胆固醇、3-羟基丁酸、乙酰乙酸、胆碱、谷氨酸、*N*-乙酰天门冬氨酸等的信号峰降低。脑脉通中剂量组与尼莫地平组峰信号基本一致。图中代谢物化学位移如下:脂蛋白(δ 0.86),胆固醇(δ 0.82, 0.9),亮氨酸(δ 0.95, 0.97), 3-羟基丁酸(δ 1.22), 乳酸(δ 1.33, 4.11), 丙氨酸(δ 1.46), *N*-乙酰天门冬氨酸(δ 2.02), 谷氨酰胺(δ 2.1, 3.78), 谷氨酸(δ 2.14), 乙酰乙酸(δ 2.22), 丙酮酸(δ 2.36), 2-酮戊二酸(δ 2.38), 柠檬酸(δ 2.52), 二甲胺(δ 2.71), 肌酸(δ 3.02), 胆碱(δ 3.22), 牛磺酸(δ 3.26, 3.42), 苏氨酸(δ 3.40, 3.48), 脯氨酸(δ 3.45), 甘氨酸(δ 3.54), 丙三醇(δ 3.56, 3.64), 瓜氨酸(δ 3.71), 酪氨酸(δ 3.94)。

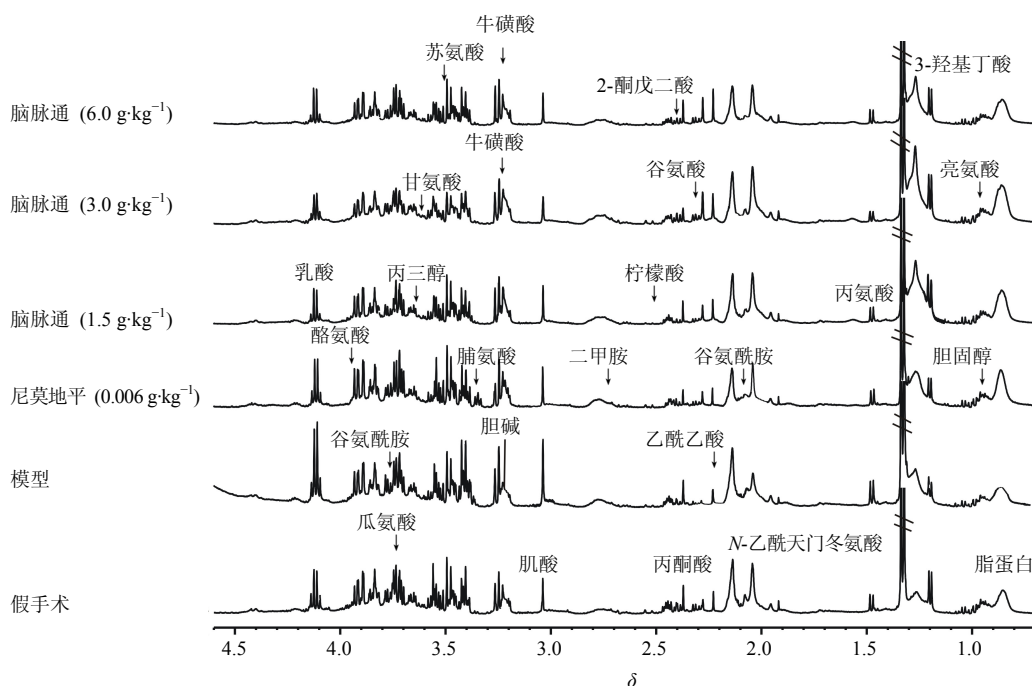


图 1 各组大鼠血浆 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中主要代谢物峰归属

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ peak attribution of main metabolites in plasma of rats in each group

3.2 PCA 分析

实验中每组最终存活大鼠数量虽减少,但符合统计学样本数。采用 PCA 方法对各组大鼠血浆 $^1\text{H-NMR}$ 谱数据进行分析,图 2 中两个坐标轴 PC1、PC2 分别代表主成分分析里贡献率较大的两个主成分,Score 图中不同的点对应不同组的被测样品。由图 2-A 可见,假手术组与模型组明显分开,说明造模成功;图 2-C 显示不同剂量的脑脉通对大鼠的治疗趋势,可见脑脉通各剂量对脑缺血再灌注模型大鼠有不同程度的治疗作用,其中中剂量的效果更

接近尼莫地平,表明脑脉通中剂量对大鼠脑缺血再灌注的作用最为显著。图 2-C 中,脑脉通中、低剂量组各有一点在 95%可信区域外,其原因可能是大鼠之间的个体差异,观察这两只大鼠的血浆 $^1\text{H-NMR}$ 谱,发现均具有异常高的脂信号,所以在下面的统计分析中将这两只大鼠剔除。图 2-B 和图 2-D 中显示了血浆中主要内源性代谢物的变化,从中找出具有明显变化的内源性代谢物进行 SPSS 分析(表 1),并对其在代谢过程中对机体所产生的影响进行讨论。

3.3 血浆中主要代谢物

对几种变化明显的血浆内源性代谢物归一化值进行 SPSS 分析, 结果显示, 脑脉通剂量为 3.0 g/kg 时能抑制 MCAO 引起的大鼠血浆中谷氨酰胺、牛磺酸、酪氨酸、乳酸水平的升高, 提高脂类、胆固醇、3-羟基丁酸、*N*-乙酰天门冬氨酸、乙酰乙酸、

谷氨酸、胆碱等的水平, 使它们趋于正常。主要代谢物积分数据归一化值见表 1。

3.4 脑组织病理学观察

假手术组大鼠脑皮层神经元排列有序, 细胞核大, 胞浆少。模型组大鼠脑组织细胞胞体肿胀、气体样变、细胞稀疏、间隙增宽、软化灶形成, 细胞排列

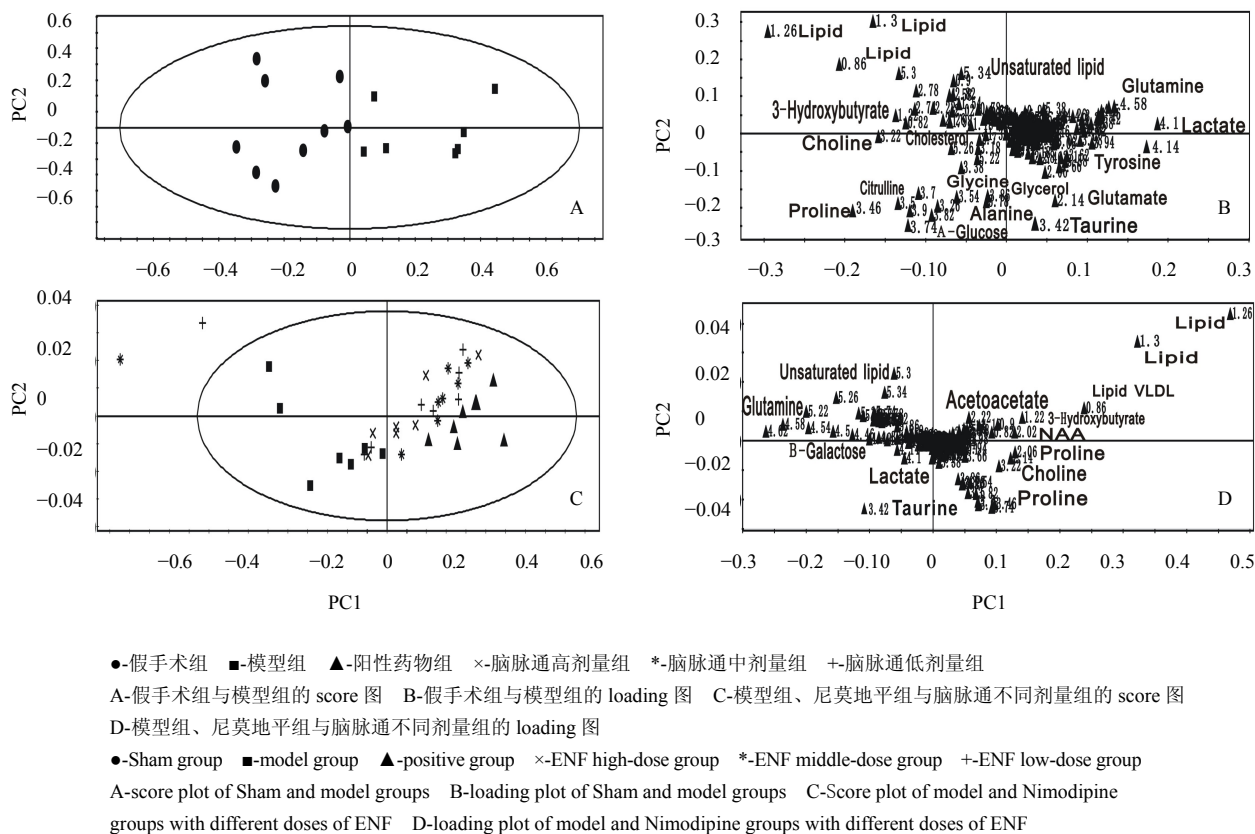


图 2 血浆 ^1H -NMR 谱 PCA 分析

Fig. 2 PCA analysis of plasma ^1H -NMR spectra

表 1 血浆中主要代谢物统计分析

Table 1 SPSS analysis on main metabolites in plasma

组 别	代谢物					
	谷氨酰胺	牛磺酸	酪氨酸	乳酸	脂类	胆固醇
假手术	0.013 82±0.001 86	0.003 36±0.000 48	0.010 10±0.001 16	0.011 32±0.002 25	0.036 72±0.008 30	0.013 00±0.003 66
模型	0.014 17±0.001 99	0.006 62±0.002 76*	0.011 62±0.001 14**	0.014 39±0.003 34*	0.026 25±0.003 78**	0.010 93±0.001 22*
脑脉通 (0.3 g·kg ⁻¹)	0.013 71±0.002 22	0.004 98±0.003 86	0.010 71±0.000 98	0.010 56±0.001 37▲▲	0.037 14±0.009 28▲▲	0.013 43±0.003 31▲▲
组 别	代谢物					
	3-羟基丁酸	<i>N</i> -乙酰天门冬氨酸	乙酰乙酸	谷氨酸	胆碱	
假手术	0.019 64±0.001 79	0.019 01±0.002 04	0.007 21±0.001 36	0.004 09±0.000 51	0.024 25±0.002 42	
模型	0.016 20±0.002 65	0.017 53±0.001 03	0.005 18±0.000 80**	0.003 92±0.000 67	0.020 51±0.002 00	
脑脉通 (0.3 g·kg ⁻¹)	0.021 07±0.005 04▲	0.020 48±0.003 85▲	0.007 87±0.001 84▲▲▲	0.004 42±0.000 72	0.021 76±0.003 22	

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ ▲▲▲ $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ ▲▲▲ $P<0.001$ vs model group

紊乱、结构不清；脑皮质中神经元中央性尼氏小体溶解和坏死，核固缩变圆，髓质中胶质细胞稀疏变性，证实模型成功。脑脉通中剂量组细胞外间隙较小，神经胞浆、核膜相对清晰，多数神经元、胶质细胞结构

较完整，形态相对正常，细胞及间质水肿的病理改变较模型组明显减轻，接近假手术组，表明脑脉通中剂量能减轻大鼠脑缺血再灌注病理损伤，缓解脑部缺血、缺氧状态，维持脑组织生理平衡。结果见图3。

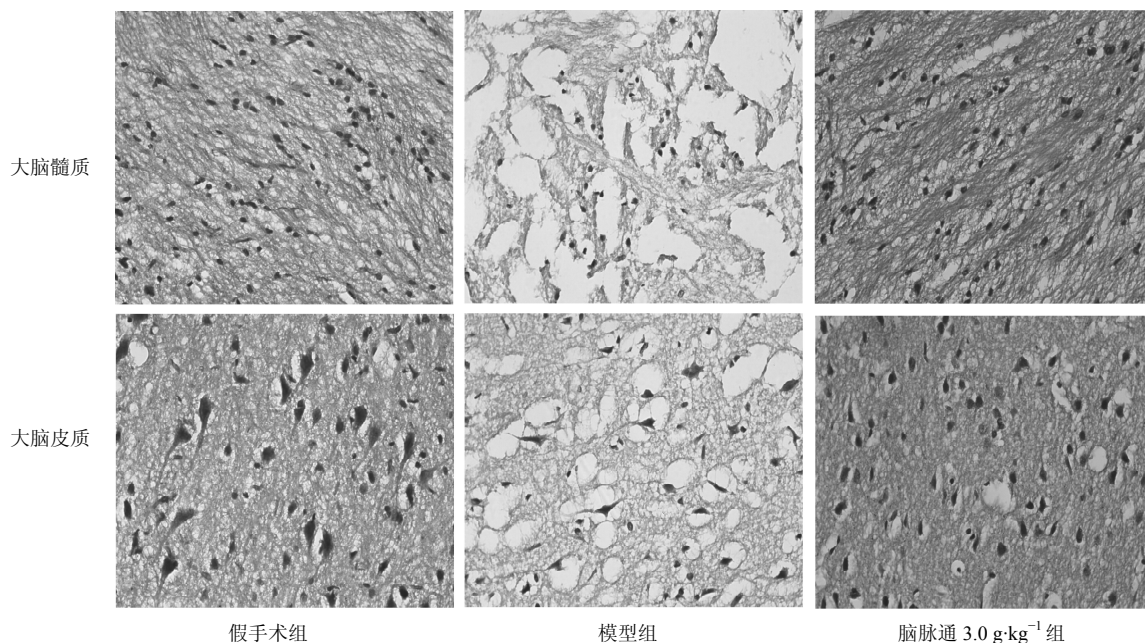


图3 大鼠脑组织病理学观察

Fig. 3 Pathological observation of rat brain tissue

4 讨论

N-乙酰天门冬氨酸仅存在于神经组织，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，量的下降也提示神经元受损^[15]。由图1和表1可以看出，脑缺血大鼠血浆中的*N*-乙酰天门冬氨酸的量是低的。李洪军等^[16]运用NMR分析脑组织中的*N*-乙酰天门冬氨酸，发现其在缺血性脑卒中患者血液中的量降低。乙酰辅酶A和天门冬氨酸在*L*-天门冬氨酸*N*-乙酰转移酶的催化下合成*N*-乙酰天门冬氨酸，这种酶主要存在于神经细胞的线粒体内，由于大鼠在缺血、缺氧情况下脑内供能不足，因此该酶的合成受到抑制。另一方面，*N*-乙酰天门冬氨酸被天门冬氨酸酰酶分解后，转运出神经细胞，在胞外酶的作用下继续分解。本实验中，*N*-乙酰天门冬氨酸的降低，提示脑缺血再灌注大鼠的神经元细胞受损，神经功能降低。

酮体在肝细胞的线粒体中合成，能通过血脑屏障，是心肌和骨骼肌，尤其是脑组织的重要能源，其中3-羟基丁酸、乙酰乙酸是酮体的2个组分。由图1和表1可知，3-羟基丁酸、乙酰乙酸在模型组中的信号峰和量较假手术组和脑脉通中剂量组均降

低。脑缺血模型大鼠脑组织处于缺血、缺氧状态，能量代谢紊乱，酮体量的降低提示脑组织能量供应不足。脑脉通中剂量可使大鼠血浆中3-羟基丁酸、乙酰乙酸水平趋于正常，结果趋近于假手术组，表明脑脉通中剂量有效地缓解脑组织能量代谢紊乱，为损伤的脑组织提供能量。

正常动物脑组织中细胞能量代谢以有氧呼吸为主，一般情况下检测不出乳酸。大鼠在缺血、缺氧的情况下，脑组织中葡萄糖分解代谢生成丙酮酸的量超过了三羧酸循环的氧化能力，而剩余的丙酮酸在胞浆中累积，在乳酸脱氢酶的作用下转变成乳酸，大量乳酸通过细胞质膜上的载体转运进入血液。乳酸是酸性化合物，可引起乳酸性酸中毒，加剧细胞毒性脑水肿，对神经细胞具有直接的损伤作用^[17]。在图1的模型组¹H-NMR谱中，乳酸的信号是6个组中最强的。提示脑组织乳酸中毒，神经元细胞受损，本实验造模成功。

牛磺酸是抑制性氨基酸，由半胱氨酸在双加氧酶催化下氧化成磺酸丙氨酸，然后脱羧生成，脑组织中含有较多的牛磺酸。动物在缺血再灌注时，脑组织内牛磺酸的量偏高（表1）。在兴奋性神经毒性

及缺氧的研究中发现牛磺酸可维持线粒体的功能,降低谷氨酸神经毒性引起的钙内流,对神经具有保护作用,其作用机制是由土的宁敏感的甘氨酸受体所介导的^[18]。牛磺酸与 γ -氨基丁酸(GABA)相互作用,激活GABA受体和甘氨酸受体,强化神经抑制效应^[19],协助 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 等离子的转运,维持细胞内外正常的渗透压的功能^[20]。高剂量的牛磺酸也表现出神经毒性^[21],它的升高,说明脑缺血再灌注大鼠脑组织中产生了兴奋性神经毒作用,机体应激性的升高体内的牛磺酸的量来维持平衡。

综上所述,脑脉通通过调节大鼠内源性物质的变化,保护脑组织细胞,维持体内正常生理代谢平衡,对大鼠MCAO模型起到显著的治疗效果。这为脑脉通治疗机制的研究提供了新思路和新途径。

参考文献

- [1] 林森. 缺血性中风的中西医治疗研究进展[J]. 中医药导报, 2011, 17(3): 119-121.
- [2] 齐聪濡, 孔祥玉. 中药对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2008, 25(4): 416-418.
- [3] 陈剑梅, 郭洁文, 潘竞锵. 中药治疗缺血性中风的药理研究进展[J]. 今日药学, 2011, 21(3): 138-141.
- [4] 任小巧, 李建生, 封银曼, 等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注损伤脑保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(1): 66-68.
- [5] 李建生, 任小巧, 刘正国, 等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(10): 947-949.
- [6] 李建生, 邓西方, 任小巧, 等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血再灌注细胞因子的影响[J]. 中国医药学报, 2004, 19(8): 471-473.
- [7] 颜贤忠, 赵剑宇, 彭双清, 等. 代谢组学在后基因组时代的作用[J]. 波谱学杂志, 2004, 21(2): 263-271.
- [8] 王战国, 胡慧玲, 兰轲, 等. 试论基于代谢组学与方证理论的药效学-药动学方法研究中中药复方配伍规律[J]. 中草药, 2009, 40(2): 169-172.
- [9] 王建农, 顾士萍, 谭仁祥, 等. 基于植物代谢组学混合物氢谱测定概念快速发现先导化合物的方法学研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 812-814.
- [10] 郑兴宇, 高晓霞, 刘晓节, 等. 基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 175-179.
- [11] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [12] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002(1): 153-161.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S L, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] Bederson J B, Pitts L H, Germano S H, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1966, 17(6): 1304-1308.
- [15] Urenjak J, Williams S R, Gadian D G, et al. Metabolic profile of various neural cells: A basis for interpreting ^1H -NMR brain spectra *in vivo* [J]. *Neurochem Int*, 1992, 21(1): D5.
- [16] 李洪军, 张晨. *N*-乙酰天门冬氨酸与卒中[J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2005, 13(3): 210-212.
- [17] Avital S, Ralphiel S P, James J M, et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2001, 895(1/2): 268-272.
- [18] Tanabe M, Nitta A, Ono H. Neuroprotection via strychnine-sensitive glycine receptors during post-ischemic recovery of excitatory synaptic transmission in the hippocampus [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113(4): 378-386.
- [19] Mathers D A, McCarthy S M, Cooke J E, et al. Effects of the beta-amino acid antagonist TAG on thalamocortical inhibition [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(8): 1097-1105.
- [20] Liu H Y. Taurine modulates calcium influx through *L*-type voltage-gated calcium channels in isolated cochlear outer hair cells in guinea pigs [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 399(1/2): 23-26.
- [21] Yu S S, Wang M, Li X M, et al. Influences of different developmental periods of taurine supplements on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area of rats following prenatal and perinatal lead exposure [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7(1): 51.