

• 药理与临床 •

基于 UPLC-Q/TOF-MS 的丹参-川芎对局灶性脑缺血大鼠保护作用的脂质组学研究

韦园诗¹, 朱黎霞², 黄星星¹, 张英丰^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 南方医科大学珠江医院 中医科, 广东 广州 510282

摘要: **目的** 研究丹参-川芎水煎液冻干物对局灶性脑缺血模型大鼠脂质代谢异常的调节作用。**方法** 采用线栓法复制大鼠局灶性脑缺血模型, 将 SD 大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组及丹参-川芎干预组。末次给药后采集血浆, 采用超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC-Q/TOF-MS) 进行血浆脂质组学研究, 采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 处理脂质组学数据, 考察丹参-川芎干预前后脂质代谢物组变化。**结果** 成功复制了大鼠局灶性脑缺血模型, 丹参-川芎水煎液冻干物对局灶性脑缺血大鼠异常脂质代谢表现出明显的改善作用, 大鼠脑缺血损伤血浆脂质标志物为 PS (21:0/0:0)、PG (12:0/17:0)、C16 sphinganine, phytosphingosine、PE [18:1(9Z)/0:0]、PC (16:1/2:0)、PC (0:0/18:0)、PC (16:1/0:0)、PC (16:0/0:0)、PC (18:2/0:0)、PC (18:1/0:0)、PC (18:0/0:0)、PC (20:5/0:0)。**结论** 丹参川芎水煎液冻干物具有脑缺血损伤保护作用, 其机制可能与其对脂质, 尤其是磷脂酰胆碱 (PC) 的调节有关。

关键词: 丹参; 川芎; 超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱联用; 局灶性脑缺血; 脂质组学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)02-0408-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.020

Lipidomics study of protective effect of *Salvia miltiorrhiza* and *Ligusticum chuanxiong* on rats with focal cerebral ischemia injury based on UPLC-Q/TOF-MSWEI Yuan-shi¹, ZHU Li-xia², HUANG Xing-xing¹, ZHANG Ying-feng¹

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To study the regulating effect of freeze-dried substances of *Salvia miltiorrhiza* and *Ligusticum chuanxiong* Decoction on lipid metabolism abnormality in focal cerebral ischemia rats. **Methods** The focal cerebral ischemia rat model was established by monofilament method. The rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, and drug treatment group. Plasma was collected after the last dosage and UPLC-Q/TOF-MS was used to study the plasma lipidomics. The lipidomics data were analyzed by orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA), and the lipid metabolites changes were examined before and after the intervention of *S. miltiorrhiza* and *L. chuanxiong*. **Results** The focal cerebral ischemia rat model was successfully repeated. The *S. miltiorrhiza* and *L. chuanxiong* Decoction freeze-dried substances obviously reversed the abnormal lipid metabolism profile in the focal cerebral ischemia rat model. The plasma lipid biomarkers of ischemia injury rat were PS (21:0/0:0), PG (12:0/17:0), C16 sphinganine, phytosphingosine, PE [18:1 (9Z)/0:0], PC (16:1/2:0), PC (0:0/18:0), PC (16:1/0:0), PC (16:0/0:0), PC (18:2/0:0), PC (18:1/0:0), PC (18:0/0:0), and PC (20:5/0:0), respectively. **Conclusion** *S. miltiorrhiza* and *L. chuanxiong* Decoction freeze-dried substances have protective effects on cerebral ischemia injury, which may be related to the regulation of abnormal lipid metabolism, especially for phosphatidylcholines (PCs).

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; *Ligusticum chuanxiong* Hort.; UPLC-Q/TOF-MS; focal cerebral ischemia injury; lipidomics

收稿日期: 2018-04-22

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A020221102); 广州中医药大学“青年英才”资助项目 (QNYC20140106)

作者简介: 韦园诗, 女, 硕士研究生。E-mail: gzytcm2016@163.com

*通信作者 张英丰, 副教授。Tel: (020)39358043 E-mail: zyfeng-2006@163.com

缺血性脑卒中具有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点,严重威胁老年人身体健康和生活质量。脑缺血损伤是多机制、多信号通路网络共同参与的极为复杂的病理过程,脑缺血后一系列级联生化反应(如谷氨酸兴奋性毒性、钙离子内流、炎症反应、脑水肿、血脑屏障的损坏、细胞坏死)所引起的神经损伤^[1]构成了脑缺血损伤的内在基础。

近年来发现脂质参与了脑缺血损伤/保护的诸多病理环节,其在脑缺血损伤进程中具有特殊地位。缺血性脑卒中患者往往存在胆固醇升高及磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)降低等脂质代谢紊乱症状^[2]。脑缺血后磷脂酶 A2 激活导致溶血磷脂增加^[3],脑实质活性氧增加同样会提升溶血磷脂水平,其可加重炎症反应^[4]。整体、动态、全面评价脑缺血损伤对其预后评价、药物疗效评估具有重要意义。脂质组学是对脂质进行系统分析,比较不同生理状态下脂代谢网络的变化,进而识别代谢调控中关键脂质生物标志物的新兴学科^[5],有助于从整体评价药物的作用特性。

中医药在防治缺血性脑卒中方面积累了丰富的治疗经验,丹参-川芎是用于缺血性脑卒中治疗的常用药对^[6-9],目前对其研究常在脑缺血/再灌注的整体动物、离体器官药效学层面上^[10],尚无代谢组学或脂质组学的相关报道。本研究基于脂质在脑缺血损伤中发挥的重要作用,采用超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF-MS)检测经丹参-川芎药对按《中国药典》常用量干预的局灶性脑缺血模型大鼠的血浆脂质代谢物的变化,采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法寻找潜在的脂质生物标志物,并由此探索丹参-川芎药对脑缺血损伤保护作用的机制,为新药研发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UPLC-Q/TOF-MS:日本岛津 LC-30AD 超高效液相,含 SIL-30AC 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱;美国 AB/SCEIX 公司 AB SCEIX Triple™ TOF 5600+ 飞行时间质谱,含 Analyst TF 1.7、PeakView Software、MarkerView 工作站。LGJ-12 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);TDX-1 涡旋混合器(北京方通达科技有限公司);E3116R 台式高速低温离心机(美国 Essenscienc 公司);24 孔氮吹仪(青岛海科科技有限公司);V8 涡旋混合器(美国 Essenscienc 公司);Finnpipette F2 移液枪(Thermo

Scientific 公司);MDFC8V-80 °C超低温冰箱(日本 Panasonic 公司)。

1.2 试药与试剂

丹参药材(广州至信药业有限公司,批号 190901)、川芎药材(广州至信药业有限公司,批号 161201),均由广州中医药大学张英丰副教授鉴定,分别为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎和伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎;2,6-二叔丁基-4-甲基酚(BHT,美国 Sigama 公司);乙腈(色谱纯,批号 QAFA1H,霍尼韦尔公司);TTC 染色试剂(Sigma 公司,批号 T8877);实验用超纯水通过 MILLI-Q 系统获得。

1.3 动物

清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 300~350 g,广州中医药大学动物实验中心提供,生产许可证号 SCXK(粤)2013-0020。

2 方法

2.1 丹参-川芎水煎液冻干物的制备

根据《中国药典》用量,以丹参-川芎(15:10)的比例,取药材于 500 mL 烧杯中,去离子水浸泡 15 min,加水煎煮 2 次,加水量分别为 4、3 倍,时间依次为 30、20 min,煎好后滤过并压榨药渣。将水煎液和压榨液合并,静置、离心,吸取上清液于冷冻干燥机托盘中,-80 °C预冻 12 h,-80 °C、1 Pa 条件下真空冷冻干燥 36 h,冻干物(经 HPLC 及 UPLC 测定,冻干物中含丹酚酸 B 31.1 mg/g、阿魏酸 1.2 mg/g)真空干燥器保存备用。临用前加生理盐水溶解。

2.2 大鼠局灶性脑缺血模型的复制与评价

2.2.1 模型制备^[11] 取 SD 大鼠,麻醉后仰位固定,钝性分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),分别在 CCA 近心端、ICA 和 ECA 根部近分叉处挂线备用,结扎 CCA 近心端以及 ECA,在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一“V”形切口,将栓线(取直径 0.26 mm 尼龙鱼线 50 mm,一端酒精灯加热使之成光滑球面,将其垂直浸入在熔化的石蜡中并迅速提起,立即凝固的石蜡可牢固地黏附在鱼线表面,使其头端圆滑。在距球面 20、30 mm 的位置做标记,浸泡 0.1%的多聚赖氨酸溶液中,取出自然风干)插入到 ICA,用眼科镊轻推栓线送入颅内,从血管分叉处开始算,插入深度在 17 mm 时稍有阻力感时立即停止,结扎 ICA 以固定线栓,缝合皮肤。实验结束后将大鼠断头处死,迅速冰上

取出脑组织。

2.2.2 神经行为学评分 采用5级4分评分法。0分：无神经功能缺损症状；1分：轻度神经功能缺损，提尾时不能完全伸展对侧前肢；2分：中度神经功能缺损，出现追尾征；3分：重度神经功能缺损，行走困难，向对侧倾倒；4分：不能自发行走，意识水平下降。

2.2.3 TTC染色 大鼠脑组织快速冷冻约20 min，去除小脑、脑干。冠状切片均匀切成2 mm厚度的脑组织5~6片，迅速置于1% TTC磷酸盐缓冲液中，37℃恒温避光孵育15~30 min，不时翻动脑片使其染色均匀，待完全显色后置4%多聚甲醛溶液中固定保存。

2.2.4 舍弃标准 无明显神经功能缺损表现或症状很轻，评分低于1分者；蛛网膜下腔出血、大脑中动脉起始部或其附近的大脑动脉环动脉有凝血块者；未存活到规定时间点死亡者；TTC染色未见梗死灶者。

2.3 分组与给药

雄性SD大鼠随机分为对照组8只、假手术组8只、丹参-川芎干预组9只、模型组8只。假手术组麻醉后分离右颈总动脉结扎，不植入线栓，缝合伤口。模型组按照上述方法造模并进行神经行为学评分，按照入选和舍弃标准确定最终样本量。对照组、模型组、假手术组每天ig给予生理盐水，丹参-川芎干预组造模后，第2天按照体表面积折算给予相应体积的冻干粉（总生药剂量为2.916 g/kg，丹参生药剂量1.944 g/kg，川芎生药剂量0.972 g/kg）生理盐水溶液，连续7 d。末次给药1 h后各组大鼠眼内眦采抗凝血1 mL，4℃、4 000 r/min离心10 min分离血浆，-80℃保存备用。

2.4 丹参-川芎干预大鼠局灶性脑缺血的脂质组学研究

2.4.1 液质联用条件 (1)UPLC色谱条件：Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm，含保护柱），柱温30℃，样品室温度4℃，流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)，梯度条件：0~3 min，90%~40% A；3~6 min，40%~20% A；6~9 min，20%~10% A；9~10 min，90%~100% B；10~13 min，100% B；13~14 min，100%~10% B；14~15 min，10% B；体积流量0.3 mL/min。(2)质谱条件：在全扫描获得一级谱图的同时进行数据相关采集模式(IDA)获得二级谱图。

正离子模式：一级质谱 m/z 扫描范围为100~2 000，质量偏差为 m/z 0.050，碰撞能(CE)为45 eV。二级质谱采用 high sensitivity 模式， m/z 扫描范围为50~2 000，碰撞能为45 eV。离子源雾化气(GS1)和辅助气(GS2)均为55 Pa，帘气(curtain gas, CG)为35 Pa。温度为500℃，喷雾电压为5 500 V，去簇电压(DP)为80 V。负离子模式：一级质谱 m/z 扫描范围为100~2 000，质量偏差为 m/z 0.050，碰撞能为45 eV，二级质谱 m/z 扫描范围为50~2 000，碰撞能为45 eV。GS1和GS2均为55 Pa，CG为35 Pa。温度为500℃，喷雾电压为-4 500 V，DP为-100 V。

2.4.2 血浆样品前处理及测定 血浆自然解冻后精密吸取0.15 mL血浆于1.5 mL离心管内(冰上操作)，加入0.45 mL 4℃氯仿-色谱甲醇混合液(2:1，含0.01% BHT)涡旋60 s，室温下静置5 min，加入115 μL超纯水混匀，12 000 r/min离心10 min，体系分为上层水相、中间层蛋白沉淀物、下层有机相。吸取下层液200 μL至5 mL刻度离心管内，40℃氮气吹干，加300 μL乙腈涡旋1 min，转移至1.5 mL离心管内，-20℃冷冻后13 000 r/min离心10 min，2次，吸取上清液200 μL于装有内衬管的样品瓶中进行。正、负离子模式各进样4 μL，获得总离子流图(TIC)。

取各组血浆样品等体积混合，前处理后作为质控样品。正式进样前连续进样6次使系统预适应和平衡。分析过程按照“对照组-模型组-假手术组-丹参-川芎干预组”的顺序交叉进样，每进8份样品进样1次质控样品，用于评价整个实验过程中系统稳定性。

2.4.3 脂质组学数据处理 采用PeakView Software软件进行峰校准、背景扣除、面积归一化和数据简化处理，MarkerView软件生成正、负离子模式下的样品名-质荷比与保留时间数据对-离子强度的三维矩阵，经过滤噪处理后，导入SIMCA-P 14.1软件(瑞典Umetrics公司)，进行标准化前处理，采用Hotelling's T²及DModX模型筛选异常样本。

采用Pareto标度法(Par)对对照组和模型组进行OPLS-DA处理，建立脂质组学模型，以 R^2 (cum, 表示所解释的模型差异)、 Q^2 (cum, 表示所预测的模型差异)作为脂质组学模型优劣的标准，自动拟合提取主成分。通过S型图(S-plot)、VIP图，识别局灶性脑缺血模型血浆脂质生物标志物。通过七

重循环交叉验证 (cross validation, CV) 及 300 次迭代置换检验以评价及确认模型的质量。

在进行准分子离子峰的归纳后, 通过脂质组学数据分析, 以变量重要性投影值 (variable importance in the projection, VIP) > 1、Jack-knife 不确定区间不跨越零点、S-plot 中 $|P_{\text{corr}}| > 0.58$ 为脂质生物标志物的入选标准。同时采用 SPSS 19 软件 (美国 IBM 公司) 进行模型组与对照组、丹参-川芎干预组与模型组潜在脂质生物标志物 Student's *t*-test 等单维统计分析, 以 $P < 0.05$ 视为具有显著性, 并计算变异倍数 (FC)。

脂质标志物结构鉴定采用精确质量数匹配 (误差 $< 1 \times 10^{-5}$) 和二级质谱解析的方式, 检索互联网专业数据库, 如 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>)、Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>) 等, 同时依据偶氮原则、正负离子交互验证模式等信息鉴定脂质。在此基础上, 对 4 组脂质组学数据进行 OPLS-DA 分析, 结合得分图 (scores plot) 及层次聚类分析 (HCA) 图, 整体评价丹参-川芎水煎液冻干物对局灶性脑缺血损伤大鼠模型的干预作用, 分析其对脂质生物标志物的影响。通过七重循环交叉验证及 300 次迭代置换验证实验评价模型的质量。

3 结果

3.1 大鼠局灶性脑缺血模型评价

3.1.1 神经行为学评分结果 大鼠局灶性脑缺血模型术后出现明显的神经行为学症状, 如肌张力降低、跑动动作明显减少、出现追尾征等, 评分在 1~2 分。根据前期造模经验, 评分在 2 分以上者, 常常会于术后急性期死亡, 故严格控制手术操作流程及线栓插入深度对大鼠存活率至关重要。

3.1.2 TTC 染色结果 脑组织染色结果表明, 正常大鼠脑组织染为均匀的深红色, 未见苍白色的梗死区。模型组大脑缺血侧半球大部分脑组织为脑梗死区, 不染色, 呈现明显的苍白色。见图 1。



图 1 大鼠脑 TTC 染色结果

Fig. 1 TTC staining figure of rat brain

3.2 大鼠血浆 UPLC-Q/TOF-MS TIC 的特征差异

UPLC-Q/TOF-MS TIC 见图 2 和 3。代谢产物得到了良好分离, 且组间存在差异。负离子模式下所得到的信息量多于正离子模式, 色谱峰及潜在标志物个数多于正离子模式, 正、负离子模式 TIC 图存在显著差异, 正、负离子模式下模型组与假手术组主要峰强度较为接近, 而对照组与丹参-川芎干预组主要峰强度接近。

3.3 大鼠血浆脂质组学研究的异常样本筛选

以样本序号为横坐标, 绘制 Hotelling's T^2 及 DModX 图。Hotelling's T^2 图纵坐标反映了每个样本与模型得分空间的距离, 以超越 95% 临界值 [$T^2_{\text{Crit}}(95\%)$] 为可疑, 以超越 99% 临界值 [$T^2_{\text{Crit}}(99\%)$] 为高度可疑。DModX 图以超过临界值 [$DC_{\text{Crit}}(0.05)$] 2 倍可判定为异常值。结果表明, 负离子模式下各组不存在异常样本, 正离子模式下假手术组样本 6 Hotelling's T^2 值超越临界值, 高度异常, 予以剔除, 各组剩余样本参与建立模型。结果见图 4 和 5。

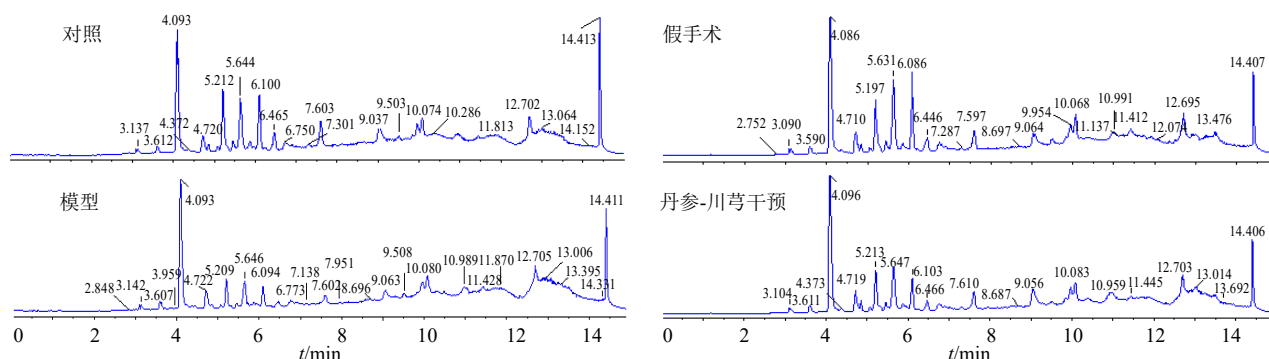


图 2 各组大鼠血浆 UPLC-Q/TOF-MS 正离子模式 TIC 图

Fig. 2 UPLC-Q/TOF-MS TIC plot of rats plasma under positive ion pattern

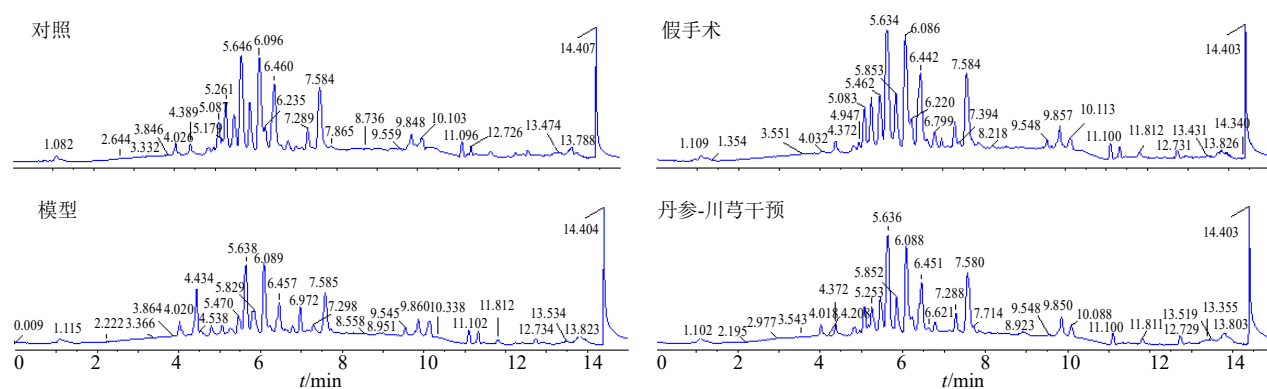


图 3 各组大鼠血浆 UPLC-Q/TOF MS 负离子模式 TIC 图

Fig. 3 UPLC-Q/TOF-MS TIC plot of rats plasma under negative ion pattern

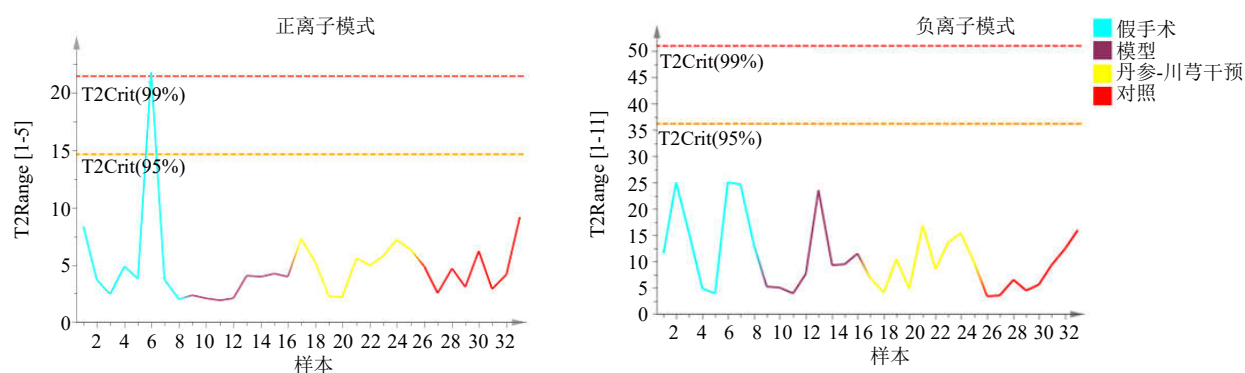


图 4 Hotelling's T2 图

Fig. 4 Hotelling's T2 plot

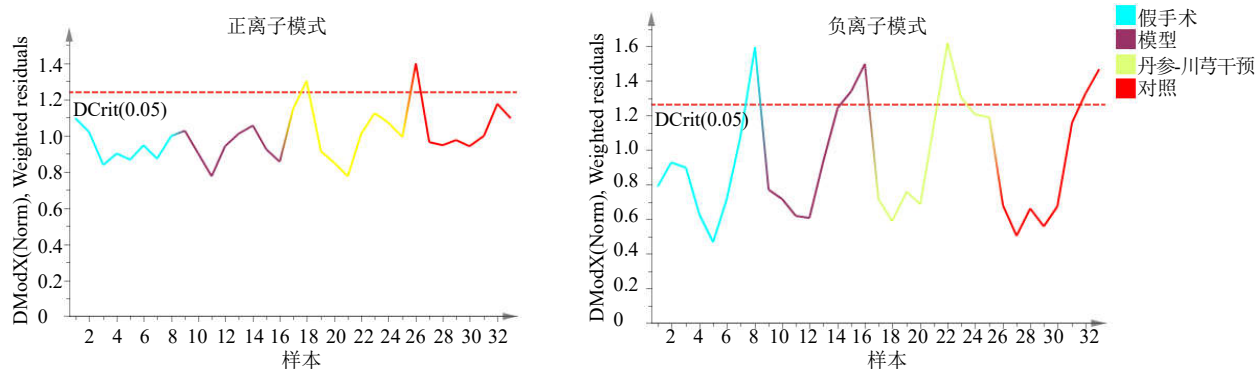


图 5 DModX 图

Fig. 5 DModX plot

3.4 大鼠脑缺血模型脂质生物标志物识别及鉴定

正、负离子模式下模型组与对照组样本脂质组学数据进行 OPLS-DA 处理, 成功建立了脂质组学模型, $R^2(\text{cum}) > 0.5$ 、 $Q^2(\text{cum}) > 0.5$, 充分提取了组间的差异信息, 具有良好的预测能力。正、负离子模式七重循环交叉验证单因素方差分析 (CV-ANOVA) 均 $P < 0.05$, 据此判别模型筛选的

组间差异代谢标志物可充分反映局灶性脑缺血模型大鼠与正常大鼠的差异特征。得分图见图 6。模型组和对照组分别位于得分空间的左、右两部分, 表明其血浆脂质组学特征存在极其显著差异。VIP 图和 S 形图见图 7、8。S 形图中标志物分布的区域差异反映了模型组标志物相较于对照组升高或降低。

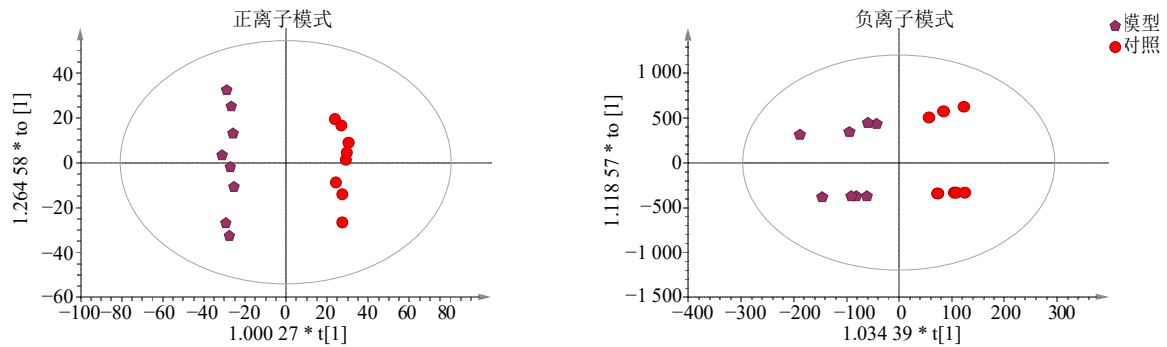


图 6 对照组与模型组脂质组学得分图

Fig. 6 Lipidomics scores plot between control and model groups

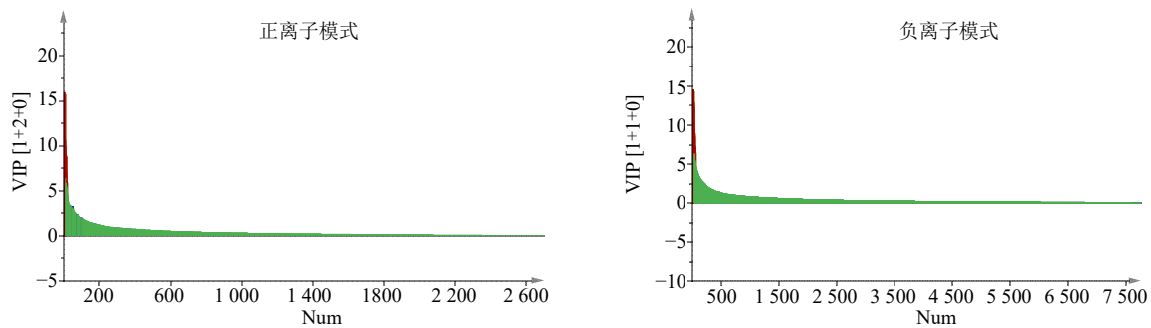


图 7 对照组与模型组脂质组学 VIP 图

Fig. 7 Lipidomics VIP plot between control and model groups

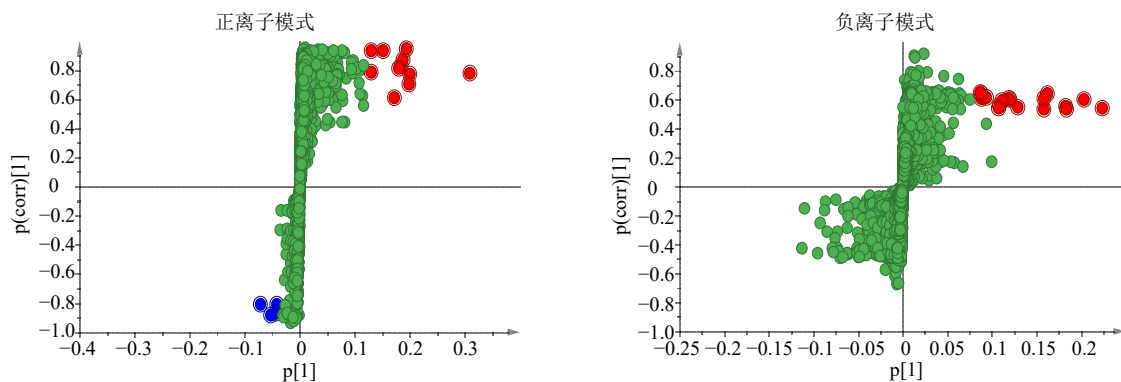


图 8 对照组与模型组脂质组学 S 形图

Fig. 8 Lipidomics S plot between control and model groups

正离子模式 300 次置换验证结果 $R^2 > Q^2$, R^2 截距为 0.753, Q^2 截距为 -0.663, 负离子模式 300 次置换验证实验结果 $R^2 > Q^2$, R^2 截距为 0.549, Q^2 截距为 -0.512。 Q^2 均在 R^2 之下, 且 Q^2 的回归直线与 y 轴的交点在负半轴, 说明该模型未过度拟合。结果见图 9。

脂质生物标志物分别为 PS (21:0/0:0)、PG (12:0/17:0)、C16 sphinganine、phytosphingosine、

PE [18:1(9Z)/0:0]、PC (16:1/2:0)、PC (0:0/18:0)、PC (16:1/0:0)、PC (16:0/0:0)、PC (18:2/0:0)、PC (18:1/0:0)、PC (18:0/0:0)、PC (20:5/0:0)。结果见表 1。

正离子模式下, m/z 606.317 7 为加合离子 $[M+K]^+$, 二级质谱具有 280.117 2、223.050 5 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PS (21:0/0:0); m/z 698.495 0 为加合离子 $[M+NH_4]^+$, 二级质谱具有 681.471 8、

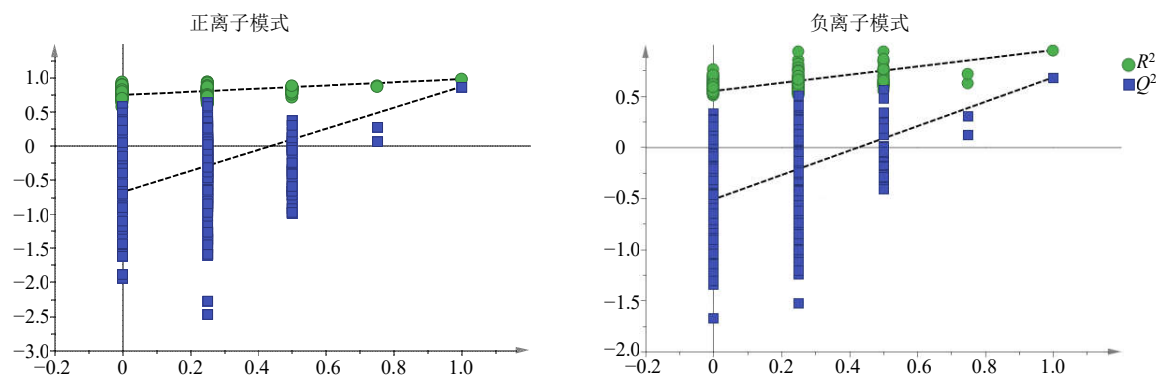


图 9 300 次迭代置换检验图

Fig. 9 Three hundred times iterations permutations test plot

表 1 基于 UPLC-Q/TOF-MS 鉴定的差异脂质代谢物

Table 1 Differential metabolites identified by UPLC-Q/TOF-MS

模式	保留时 间/min	质荷比 (m/z)		偏差/ ($\times 10^{-6}$)	脂质代谢物	$ P_{corr} $	VIP	FC*	P 值*	趋势*	FC**	P 值**	趋势**
正离子	12.70	606.317 7	606.316 8	1.48	PS (21:0/0:0)	0.81	1.98	1.85	$7.694 3 \times 10^{-5}$	↑	0.52	0.001 1	↓**
	10.79	698.495 0	698.496 7	-2.43	PG (12:0/17:0)	0.87	2.03	1.75	$6.294 6 \times 10^{-5}$	↑	0.59	0.001 0	↓**
	4.07	274.274 6	274.274 0	2.18	C16 sphinganine	0.77	9.89	0.80	$5.664 7 \times 10^{-4}$	↓	1.22	0.009 0	↑**
	4.09	318.300 4	318.300 3	0.31	phytosphingosine	0.83	8.96	0.81	$1.954 0 \times 10^{-4}$	↓	1.21	0.006 0	↑**
	6.09	497.338 6	497.335 0	7.23	PE [18:1 (9Z)/0:0]	0.87	9.19	0.27	$1.280 3 \times 10^{-5}$	↓	1.99	0.009 8	↑**
	6.09	518.320 6	518.324 1	-6.75	PC (16:1/2:0)	0.78	6.66	0.36	$4.913 9 \times 10^{-4}$	↓	1.74	0.006 2	↑**
	5.63	520.340 0	520.339 8	0.38	PC (18:2/0:0)	0.61	10.17	0.43	0.013 8	↓	1.91	0.006 9	↑**
	6.48	522.355 1	522.355 4	-0.57	PC (18:1/0:0)	0.81	9.08	0.29	$1.426 6 \times 10^{-4}$	↓	1.80	0.008 4	↑**
	7.60	524.369 5	524.371 1	-3.05	PC (0:0/18:0)	0.70	10.81	0.39	0.002 5	↓	1.99	0.001 7	↑**
	5.25	538.315 9	538.315 1	1.48	PC (16:1/0:0)	0.68	11.49	0.04	0.005 8	↓	2.50	0.004 2	↑**
负离子	5.86	540.331 7	540.330 7	1.85	PC (16:0/0:0)	0.64	11.22	0.16	0.015 8	↓	1.39	0.016 4	↑**
	5.63	564.331 7	564.330 7	1.77	PC (18:2/0:0)	0.58	13.00	0.25	0.003 3	↓	1.43	0.002 1	↑**
	6.47	566.346 5	566.346 4	0.17	PC (18:1/0:0)	0.62	14.39	0.18	0.001 8	↓	1.48	0.006 0	↑**
	7.30	568.362 3	568.362 0	0.52	PC (18:0/0:0)	0.62	7.88	0.18	0.023 3	↓	1.50	0.005 8	↑**
	5.10	586.318	586.315 1	4.94	PC (20:5/0:0)	0.68	6.13	0.04	0.001 4	↓	5.55	0.001 7	↑**

*模型组 vs 对照组, 变化倍数是仪器测得的模型组和对照组脂质成分平均相对强度的比值, ↑和↓分别代表该脂质在模型组中升高和降低;

丹参-川芎干预组 vs 模型组, 变化倍数是仪器测得的丹参川芎干预组和模型组脂质成分平均相对强度的比值, ↑和↓**分别代表该脂质在丹参-川芎干预组中升高和降低

*Model group vs control group, fold change is ratio of average relative intensity of lipid components in model group vs control group measured by instrument, The ↑ and ↓ represents increase and decrease of lipid in model group, respectively; **Danshen and Chuanxiong group vs model group, fold change is ratio of the average relative intensity of lipid components in Danshen and Chuanxiong group vs model group measured by instrument, The ↑** and ↓** represents increase and decrease of lipid after Danshen and Chuanxiong intervention group, respectively

119.085 8 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PG (12:0/17:0); m/z 274.274 6 为准分子离子 $[M+H]^+$, 具有 274.273 6、256.263 1、106.086 9 等主要二级碎片离子, 鉴定为 C16 sphinganine; m/z 318.300 4 为准分子离子 $[M+H]^+$, 具有 318.299 3、300.288 9、256.262 3、102.092 0 等主要二级碎片离子, 鉴定为 phytosphingosine; m/z 497.338 6 为加合离子 $[M+NH_4]^+$, 具有 497.343 7、184.073 5、104.107 6 等主

要二级碎片离子, 鉴定为 PE [18:1(9Z)/0:0]; m/z 518.320 6 为加合离子 $[M+H-H_2O]^+$, 具有 459.248 5、313.273 0、104.107 7 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (16:1/2:0); m/z 524.369 5 为准分子离子 $[M+H]^+$, 具有 524.372 2、184.073 2、104.107 9 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (0:0/18:0)。

负离子模式下, m/z 538.315 9 为准分子离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 478.295 7、253.217 1、224.067 8 等

主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (16:1/0:0)。m/z 540.331 7 为准分子离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 480.311 4、255.233 2、224.069 5 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (16:0/0:0)。m/z 568.362 3 为准分子离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 508.340 8、283.264 2、224.069 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (18:0/0:0)。m/z 586.318 0 为准分子离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 526.297 5、301.216 7、224.068 4 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (20:5/0:0)。

正离子模式 m/z 520.340 0 为准分子离子 $[M+H]^+$, 具有 520.340 9、184.073 0、104.107 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (18:2/0:0); 负离子模式下 m/z 564.331 7 为加合离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 504.311 2、279.232 9、224.069 1 主要二级碎片离子, 同样鉴定为 PC (18:2/0:0), 正、负离子模式具有相同的保留时间。

正离子模式 m/z 522.355 1 为准分子离子 $[M+H]^+$, 具有 522.354 7、184.072 9、104.108 0 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC (18:1/0:0); 负离子模式下 m/z 566.346 5 为加合离子 $[M+HCOO]^-$, 具有 506.326 9、281.248 6、224.069 1 主要二级碎片离子, 同样鉴定为 PC (18:1/0:0), 正、负离子模式具有相同的保留时间。

3.5 丹参-川芎水煎液冻干物可有效调节脑缺血大鼠血浆脂质代谢

正、负离子模式下各组脂质组学数据进行 OPLS-DA 处理, 所建立的脂质组学模型 R^2 (cum) > 0.5、 Q^2 (cum) > 0.5, OPLS-DA 模型充分提取了组间的差异信息, 该模型具有良好的预测能力, 模型建立成功。正离子模式 300 次置换验证实验结果 $R^2 > Q^2$, R^2 截距为 0.774, Q^2 截距为 -0.465, 负离子模式 300 次置换验证实验结果 $R^2 > Q^2$, R^2 截距为 0.848, Q^2 截距为 -0.328。由于 Q^2 均在 R^2 之下, 且 Q^2 的回归直线与 y 轴的交点在负半轴, 说明该模型未过度拟合。CV-ANOVA 结果表明均 $P < 0.05$, 结果表明所建立的脂质组学模型具有较高的可靠性, 预测性能强, 充分提取了组间的差异信息。结果见图 10~12。

得分图显示正、负离子模式下, 假手术组、模型组、丹参-川芎干预组及对照组样本组内相对集中, 离散度小, 组间良好分离, 丹参-川芎干预组靠拢对照组, 经过药物干预后体内整体脂质代谢特征趋于正常。HCA 结果显示总体上可分为假手术组与模型组、丹参-川芎干预组与对照组 2 大类, 且丹参-川芎干预组距对照组距离最短, 表明经过干预后严重偏离常态的脂质轮廓倾向于恢复常态, 丹参-川芎水煎液冻干物有效逆转了局灶性脑缺血损伤。

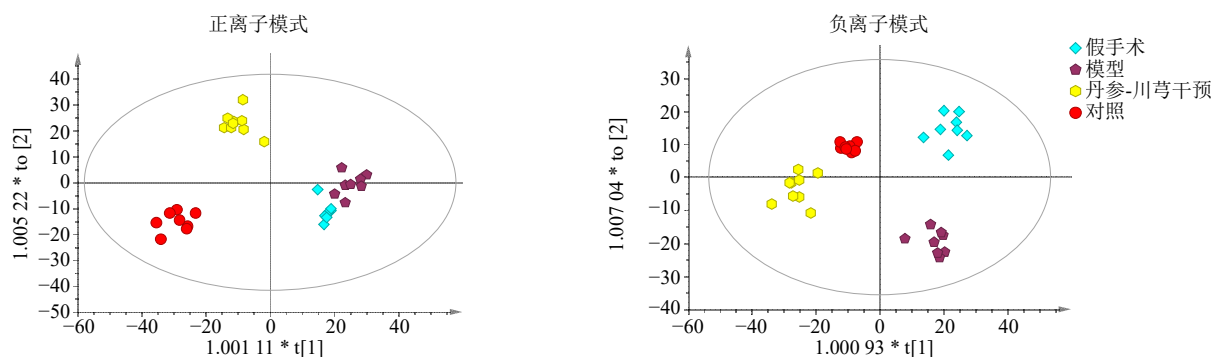


图 10 各组脂质组学数据得分图

Fig. 10 Lipidomics scores plot

4 讨论

本研究采用 UPLC-Q/TOF-MS 进行了丹参-川芎水煎液冻干物干预局灶性脑缺血大鼠模型的脂质组学研究, 发现并鉴定了部分差异脂质标志物, 整体评价了丹参-川芎的脑缺血损伤保护作用, 丹参-川芎能够使增高或降低的脂质标志物向正常状态回调, 有助于从脂质组学角度阐明丹参-川芎的抗脑缺血损伤的作用机制。

本课题结合煎煮法和真空冷冻干燥法处理药材。煎煮法符合数千年来临床传统用药习惯, 冻干物的固体形态避免了水煎液久贮易霉变、难以长期保存、需要临时制备、成分易水解氧化的缺点, 对同一批药材煎液冻干避免了水煎液重复制备因操作细节和参数的细微变化带来的成分含量和相对比例的波动及差异, 增强了对实验过程和细节的控制, 冻干物良好的水溶性最大程度地还原了水煎液本

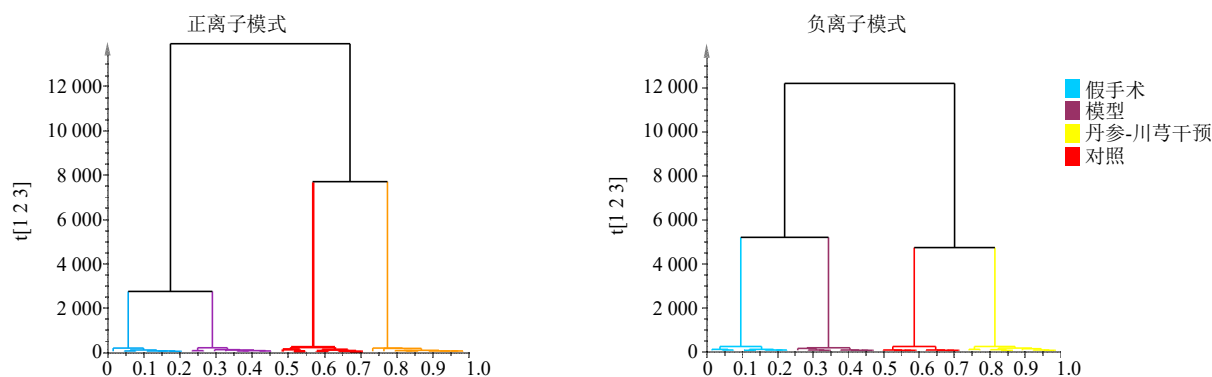


图 11 脂质组学数据层次聚类分析图

Fig. 11 Lipidomics hierarchical clustering analysis plot

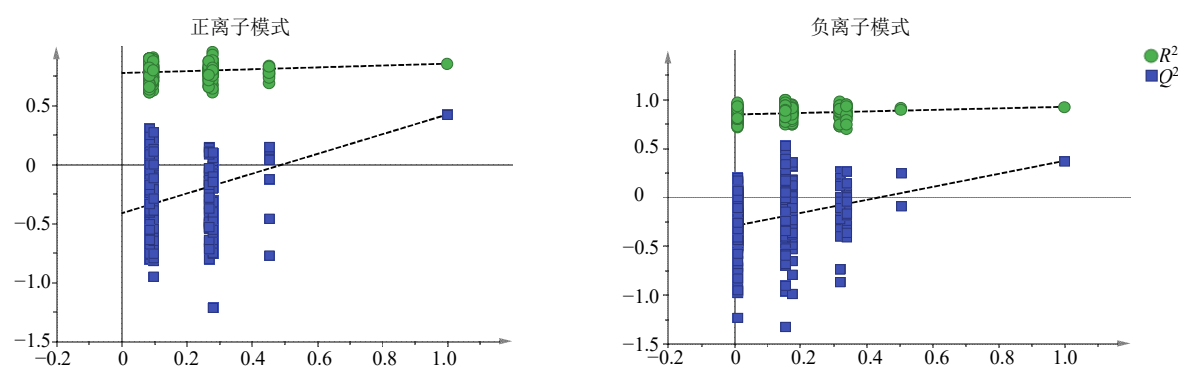


图 12 300 次迭代置换检验图

Fig. 12 Three hundred times iterations permutations test plot

质，减小了给药体积，增强了成分稳定性，有助于从源头上提高研究结果的质量、可靠性和重现性。

可靠的建模方法对脂质组学数据解析至关重要。脂质组学是代谢组学的分支学科，代谢组学建模方法同样适用于脂质组学研究。无监督的方法，如主成分分析（PCA）、聚类分析，有监督的方法，如 PLS-DA、OPLS-DA 等，在脂质组学研究中各有适用性。本研究中采用了有更高区分能力的 OPLS-DA 模型。生物标志物的发现是脂质组学研究的难点，多指标的共同参与有助于判别。VIP 的大小反映了该指标（所对应的离子强度）对组间差异的贡献能力：VIP 越大，表示该指标与样本分类信息的相关性越高；VIP > 1 表明该指标表征的组间差异大于组内误差，可作为代谢标志物的候选指标。S-plot 中每一点表示 1 个代谢物，离原点距离越远的离散点表示此物质对模型组和对照组大鼠分组的贡献越大，则成为生物标志物的可能性越大。模型组相对于对照组的离子强度变化倍数（FC）及组

间 t 检验 P 值等单变量分析，可直观显示两组间代谢物变化的显著性，从而筛选标志性代谢物。以 $-\lg P$ 对 $\log_2 FC$ 为坐标系构成的火山图有助于直观发现标志物，在代谢组学中应用越来越广泛^[12-13]。

脂质可分为脂肪酸、甘油酯、甘油磷脂等 8 大类，机体尤以甘油磷脂含量丰富，其又可细分为 PC、PE、磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酰甘油（PG）及磷脂酰肌醇（PI）等，每一大类中由于脂肪酸链的不同又包含有结构相似的诸多磷脂分子。由于脂质性质及含量差异较大，对其的全面分析是一项具有挑战性的工作。UPLC-Q/TOF-MS 结合了色谱分离和质谱检测，成为脂质组学研究的强有力分析工具。本研究发现，线栓法复制的大鼠局灶性脑缺血模型大鼠血浆脂质代谢明显异常，包括多种甘油磷脂和鞘磷脂含量的显著降低。

PC 与脑缺血联系密切。Lin 等^[14]研究表明卒中患者与健康成年人血浆 PC 含量存在显著差异。Rabiei 等^[15]发现 PC 含量与局灶性脑缺血大鼠模型

脑梗死区体积呈负相关,说明PC含量在脑缺血中扮演保护性角色。本研究结果表明脑缺血模型大鼠血浆PC含量显著下降,可作为脑缺血的生物标志物及药物干预的疗效评价指标。Koizumi等^[16]研究表明脑缺血区域PC在磷脂酶作用下转化为LPC(16:0),具体表现为PC(16:0/18:1)含量下降,LPC(16:0)含量上升。

鞘脂是具有高度生物活性、调控细胞功能的一类重要脂质,除作为细胞膜必不可少的组成部分外,还参与神经元的生长、信号传导、细胞通透性的维持、调节细胞生长、分化、凋亡等多种功能^[17-18]。鞘脂在缺血性脑卒中^[19-20]等疾病中扮演了重要角色。鞘氨醇是鞘脂的重要组成部分,促进细胞凋亡、抑制细胞生长,参与了脑缺血过程。本研究发现C16鞘氨醇和植物鞘氨醇等鞘脂在模型组大鼠血浆中显著下降,丹参-川芎可使其明显上调,其脑缺血损伤保护作用可能与此存在密切联系。

研究结果表明丹参-川芎水煎液冻干物能够有效地逆转局灶性脑缺血损伤,对局灶性脑缺血模型大鼠血浆脂质代谢异常有明显的改善作用,尤其对PC的改善更加显著。因此推测这可能与其对异常的脂质尤其是甘油磷脂代谢的改善有关,甘油磷脂代谢通路相关酶活性的调节可能是其作用机制,有关作用机制还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Xing C, Arai K, Lo E H, *et al.* Pathophysiologic cascades in ischemic stroke [J]. *Int J Stroke*, 2012, 7(5): 378-385.
- [2] 马焕文, 郭述苏, 许荣家. 缺血性中风红细胞膜流动性与膜脂质及血脂关系的研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 1998, 15(4): 219-221.
- [3] Phillis J W, O'Regan M H. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders [J]. *Brain Res Rev*, 2004, 44(1): 13-47.
- [4] Fuchs B, Schiller J. Lysophospholipids: Their generation, physiological role and detection. Are they important disease markers? [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2014, 9(3): 368-378.
- [5] Sethi S, Brietzke E. Recent advances in lipidomics: Analytical and clinical perspectives [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 2017(S128/129): 8-16.
- [6] 朱建伟, 郑广娟. 川芎、丹参及其配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤的不同影响 [J]. *时珍国医国药*, 1997, 8(3): 232-233.
- [7] 张 曦, 陈明津. 丹参川芎治疗急性缺血性脑卒中的效果分析 [J]. *吉林医学*, 2016, 37(10): 2417-2418.
- [8] 杨 倩, 吕莉莉, 孙 蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(11): 2606-2613.
- [9] 许珍晶. 丹参川芎嗪注射液治疗后循环缺血性眩晕的临床评价 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(9): 1334-1337.
- [10] 张翠英. 丹参川芎对药及其组方冠心宁制剂治疗心脑血管疾病的研究进展 [J]. *中成药*, 2017, 39(5): 1018-1024.
- [11] 赖宝林. 芎冰微乳鼻腔给药的脑靶向性及脑局部PK-PD结合模型研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [12] 杨秀娟, 邓 毅, 吴国霞, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS的归身和归尾补血机制的代谢组学初步研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(2): 176-184.
- [13] 芦 晋, 任 雪, 刘相良, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱联用法用于宫颈癌患者尿液代谢组学研究 [J]. *分析化学*, 2018, 46(1): 67-73.
- [14] Lin S N, Horning E C. Analysis of long-chain acids or human plasma phosphatidylcholines (lecithins) and cholesteryl esters by glass open tubular capillary column gas chromatography for stroke patients and for normal subjects [J]. *J Chromatogr*, 1975, 112: 483-497.
- [15] Rabiei Z, Bigdeli M R, Mohagheghi F. Effect of dietary virgin olive oil on infarct volume and brain ceramide, cerebroside and phosphatidylcholine levels in rat stroke model [J]. *J Shahrekord Univ Med Sci*, 2013, 15(1): 23-31.
- [16] Koizumi S, Yamamoto S, Hayasaka T, *et al.* Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain [J]. *Neuroscience*, 2010, 168(1): 219-225.
- [17] Davies L, Fassbender K, Walter S. *Sphingolipids in Neuroinflammation* [M]. Berlin: Springer Vienna, 2013.
- [18] Zheng W J, Kollmeyer J, Symolon H, *et al.* Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(12): 1864-1884.
- [19] Khan M, Ekhon B K, Sekhon C S, *et al.* Sphingolipids in rat model of transient focal cerebral ischemia: Implication for stroke injury [J]. *J Neurochem*, 2008, 81(S1): 108-111.
- [20] Novgorodov S A, Gudiz T I. Ceramide and mitochondria in ischemic brain injury [J]. *Int J Biochem Mol Biol*, 2011, 2(4): 347-361.