

引用:龙慧玲,唐伟,陶新如,冯小龙,杨智巍,蔡媛,李鹏辉,彭艳梅.基于代谢组学探讨丹膝颗粒治疗大鼠中动脉闭塞大鼠的作用机制[J].中医导报,2025,31(6):61-66.

基于代谢组学探讨丹膝颗粒治疗大鼠中动脉闭塞大鼠的作用机制*

龙慧玲¹,唐伟²,陶新如³,冯小龙³,杨智巍⁴,蔡媛³,李鹏辉³,彭艳梅³

(1.湖南省药品审评与不良反应监测中心,湖南长沙 410013;

2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410013;

3.湖南省中医药研究院,湖南长沙 410013;

4.湘南学院,湖南郴州 423099)

[摘要] 目的:基于代谢组学探讨丹膝颗粒(DXKL)治疗大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠的作用机制。方法:使用改良线栓法建立MCAO大鼠模型,根据神经性神经功能评估丹膝颗粒对MCAO大鼠的治疗效果,并通过液质联用技术检测大鼠缺血侧脑组织代谢物的变化。结果:造模成功后,丹膝颗粒给药组能显著降低MCAO大鼠的神经功能评分($P<0.01$),代谢组学结果显示,MCAO-Sham组有12种差异代谢物,其中7个化合物上调,5个代谢物下调;MCAO-DXKL组中有38种差异代谢物,其中22个化合物上调,16个下调;共有差异代谢物为L-天冬氨酸;丹膝颗粒治疗后能显著下调L-天冬氨酸发生紊乱的代谢物水平。MCAO-DXKL组中38种差异代谢物结合差异代谢物L-天冬氨酸的KEGG通路富集结果分析,推测丹膝颗粒治疗缺血性脑卒中的作用机制可能与D-氨基酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢过程有关。结论:丹膝颗粒能够改善MCAO大鼠偏瘫的症状,显著降低神经功能评分,其机制可能与D-氨基酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢过程有关。

[关键词] 脑卒中;丹膝颗粒;脑组织;代谢组学;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)06-0061-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.011

The Mechanism of Action of Danxi Granule (丹膝颗粒) in Treating Middle Cerebral Artery Occlusion Rats Based on Metabolomics

LONG Huiling¹, TANG Wei², TAO Xinru³, FENG Xiaolong³, YANG Zhiwei⁴,

CAI Yuan³, LI Penghui³, PENG Yanmei³

(1.Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring, Changsha Hunan 410013, China;

2.Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410013, China;

3.Hunan Academy of Chinese medicine, Changsha Hunan 410013, China;

4.Xiangnan University, Chenzhou Hunan 423099, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of action of Danxi granule (DXKL) in treating middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats based on metabolomics. Methods: The MCAO rat model was established by the modified thread embolization method. The therapeutic effect of DXKL on MCAO rats was evaluated according to the neurological function score. The changes of metabolites in rat brain tissue were detected by liquid chromatography-mass spectrometry. Results: After successful modeling, the administration group of DXKL could significantly reduce the neurological function score of MCAO rats ($P<0.01$). The metabolomics results showed that there were 12 differential metabolites in the MCAO-Sham group, among which 7 compounds were

*基金项目:湖南省重点研发计划(2021SK2007);湖南省自然科学基金项目(2023JJ601130,2022JJ80075);长沙市科技局其他科技创新平台项目(kh2201061);广西重点研发计划(桂科AB22035054)

通信作者:彭艳梅,女,研究员,研究方向为中药新药研发及保健食品开发

up-regulated and 5 metabolites were down-regulated. There were 38 differential metabolites in the MCAO-DXKL group, among which 22 compounds were up-regulated and 16 were down-regulated. The common differential metabolite was L-aspartic acid. After treatment with DXKL, the metabolite level of L-aspartic acid with disordered metabolism could be significantly adjusted back. Based on the KEGG pathway enrichment results analysis of 38 differential metabolites in the MCAO-DXKL group combined with the differential metabolite L-aspartic acid, it was speculated that the mechanism of action of DXKL in treating ischemic stroke might be related to D-amino acid metabolism, cysteine and methionine metabolism processes, and glycine, serine and threonine metabolism processes. Conclusion: Danxi granule can improve the symptoms of hemiplegia in MCAO rats, and reduce the neurological function score significantly. The mechanism may be related to D-amino acid metabolism, cysteine and methionine metabolism processes, and glycine, serine and threonine metabolism processes.

[Keywords] stroke; Danxi granule; brain tissue; metabolomics; rat

脑卒中,又称脑血管意外,是一种突发的脑血液循环障碍性疾病。脑卒中包括缺血性卒中(85%)和出血性卒中(15%),以突然发病,迅速出现局限性或弥散性脑功能缺损为共同临床特征,为一组器质性脑损伤导致的脑血管疾病^[1]。心脑血管疾病是危害中老年人身体健康和生命的主要疾病之一。本病具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点,给社会、患者及其家庭带来沉重负担和痛苦^[2-3],其发病机制复杂,涉及氧化应激和炎症反应等生理病理过程^[4-6]。在中医古籍中,脑卒中被纳入“中风”范畴。《黄帝内经》中就有相关记载,如“风之伤人,或为寒热,或为热中,或为寒中,或为疔风,或为偏枯”,这里的“偏枯”就类似于脑卒中后的半身不遂症状^[7]。

丹膝颗粒原名“偏瘫灵颗粒”,由丹参、牛膝、天麻、牡丹皮、赤芍、川芎、生地黄、淫羊藿、桑寄生、栀子、决明子、火麻仁 12 味药组成,具有养阴平肝、息风通络、清热除烦的功效^[8],临床上用于中风病中经络恢复期瘀血阻络兼肾虚证,症见半身不遂,口舌歪斜,舌强语塞,偏身麻木,头晕目眩,腰膝酸软,脑梗死恢复期见上述证候者。现代药理研究表明,丹膝颗粒对大鼠患有局灶性脑血管损伤时具有显著的保护效果^[9]。目前,丹膝颗粒在治疗缺血性脑卒中方面的机制研究尚不充分。本实验基于代谢组学技术,深入探究丹膝颗粒对大鼠脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠的治疗作用机制。通过对脑组织差异代谢物的全面分析,揭示丹膝颗粒在调节代谢途径、改善病理生理状态方面的潜在作用,为进一步阐明其治疗缺血性脑卒中的分子机制提供科学依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠 18 只,体质量 250~280g,8~12 周龄,雄性,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SYXK(湘)2019-0009,动物质量合格证编号:ZS-202302280017, ZS-202304250022。饲养于湖南中医药大学实验动物中心,室温(25±2)℃,相对湿度(65±5)%,光照控制在明暗周期各 12 h,大鼠自由饮食和进水,定期更换垫料。所有实验均通过湖南中医药大学伦理委员会的批准(批准号:LL2023030101)。

1.2 药物与试剂 丹膝颗粒(九芝堂股份有限公司,批号:20220709);质谱级甲醇(德国 CNW Technologies GmbH 公司,

批号:67-56-1);质谱级乙腈(德国 CNW Technologies GmbH 公司,批号:75-05-8);质谱级乙酸铵[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号:631-61-8];氨水(赛默飞世尔科技公司,批号:1336-21-6);超纯水(屈臣氏,批号:BL112B)。

1.3 主要仪器 高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,型号:Orbitrap Exploris 120);高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司,型号:Vanquish);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司,型号:Heraeus Fresco17);电子天平[赛多利斯(上海)贸易有限公司,型号:BSA124S-CW];超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司,型号:PS-60AL)。

1.4 MCAO 模型建立与分组 使用改良线栓法^[10]制备 MCAO 模型。SD 雄性大鼠,手术前禁食不禁水 12 h,用 2% 戊巴比妥钠 0.2 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定于手术台。对脖颈处进行常规备皮和消毒,在颈部正中偏右侧作约 0.5~0.8 cm 切口,分离皮下组织,暴露颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)、颈总动脉(CCA)。分离颈总动脉并结扎颈总动脉和颈外动脉,暂时使用动脉夹封闭颈内动脉,将线栓导入颈内动脉,并在血管的分叉位置放置标记点以此阻塞右侧大脑中动脉的血流。最后,逐层缝合、消毒、清除血迹,防止大鼠之间相互咬食。术后将大鼠放置加热垫上保温至大鼠苏醒,单笼饲养。插入线栓后 2 h,将线栓拔出 1~2 cm 造成再灌注过程。对造模后大鼠进行评分,以左侧肢瘫痪,站立不稳,向一侧转圈为评判标准,选取造模成功的大鼠进行随机分组,每组 6 只,假手术组(Sham 组)只分离血管,不插线栓。缺血再灌注 24 h 后,设置丹膝颗粒给药组(16.2 g/kg,为临床给药剂量的 6 倍)、假手术组(Sham 组)和模型组(MCAO 组),给药组每日灌胃对应剂量药物,Sham 组和 MCAO 组灌胃等量蒸馏水,给药 14 d。14 d 后,处死大鼠,取大鼠脑组织,液氮保存待用。

1.5 观察指标

1.5.1 神经功能评分 参考 Longa 5 分评分法:0 分,无神经损伤症状;1 分,对侧前爪不能完全伸展;2 分,向对侧转圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。分值越高,说明动物神经行为障碍越严重。

1.5.2 脑组织样本代谢物提取 取 25 mg 脑组织样本,加入 500 μL 提取液(甲醇、乙腈、水的体积比为 2:2:1,含有同位素

标记内标混合物)。以频率35 Hz研磨处理4 min,接着在冰水浴条件下进行超声处理5 min,重复操作3次。处理后的样品于-40 ℃静置1 h,4 ℃离心(12 000 r/min,离心半径为8.6 cm)15 min后取上清液,待测。同时,将所有样品另取等量上清液混合制备成QC样品,待测。

1.5.3 LC-MS检测条件 采用Vanquish(Thermo Fisher Scientific)超高效液相色谱仪,并通过Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm×50.0 mm,1.7 μm)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。其中,液相色谱的A相为水相,含有25 mmol/L乙酸铵和25 mmol/L氨水,B相为乙腈。设置样品盘温度为4 ℃,进样体积为2 μL。Orbitrap Exploris 120质谱仪在控制软件(Xcalibur,版本:4.4,Thermo)的控制下进行一级、二级质谱数据收集。具体参数:废气流量为50 Arb,辅助气流量为15 Arb,毛细管温度为320 ℃,全MS分辨率为60 000,MS/MS分辨率为15 000,碰撞能量为SNCE 20/30/40,喷雾电压分别为3.8千伏(正电荷)或-3.4千伏(负电荷)。

1.5.4 代谢组鉴定与代谢通路分析 使用ProteoWizard软件将原始数据转换为mzXML格式,利用自行编写的R程序包(XCMS内核)进行峰的识别、提取、对齐和积分等处理,并与自建的BiotreeDB(V2.1)二级质谱数据库进行匹配,以进行物质的注释,其中算法打分的Cutoff值设定为0.3。将处理后的质谱数据导入SIMCA-P14.0软件进行统计分析、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),根据VIP>1且P<0.05的标准筛选出差异性成分。最后,将这些成分导入MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行差异代谢物的通路富集分析。

1.6 统计学方法 采用Graph pad 8.0进行实验数据的统计分析,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)来表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分比较 Sham组大鼠未经插栓处理,其表现出正常行为,无神经功能损伤,评分为0分。造模后24 h,与Sham组相比,各组大鼠神经行为评分均明显提高(P<0.01),表明大鼠脑缺血再灌注模型制备成功。连续给药14 d后,与MCAO组相比,丹膝颗粒给药组治疗的MCAO大鼠的评分显著降低(P<0.01),表明大鼠在经过14 d治疗后神经损伤得到显著缓解,丹膝颗粒能够有效改善缺血性脑卒中神经功能损伤。(见表1)

表1 各组大鼠神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	1 d	14 d
Sham组	6	0.00±0.00	0.00±0.00
丹膝颗粒给药组	6	1.67±0.516 4 ^a	0.33±0.516 4 ^b
MCAO组	6	1.80±0.408 2 ^a	1.17±0.408 2 ^a

注:与Sham组比较,^aP<0.01;与MCAO组比较,^bP<0.01。

2.2 丹膝颗粒对MCAO大鼠脑组织代谢谱的多元统计分析

2.2.1 主成分分析 采用主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)对Sham组、MCAO组、丹膝颗粒给药组的液质数据进行综合分析。PCA图显示Sham组(红色三角形表示)和MCAO组(蓝色圆圈表示)、MCAO组(蓝色圆圈表示)和DXKL

组(绿色方形表示)之间的代谢谱有明显的分离趋势,其中不同颜色的标记清晰地分布在图的不同区域,表明3组之间的代谢特征存在显著差异。(见图1)

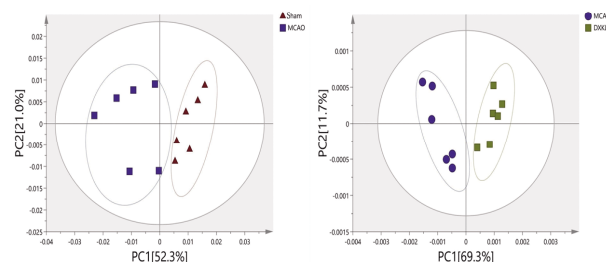


图1 各组间大鼠脑组织代谢物的PCA得分图

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 MCAO组与Sham组的正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis,OPLS-DA)得分图完全分离,该模型 $R^2Y=0.658$, $Q^2=0.759$,表明模型预测能力较好。为防止模型出现过拟合,进行200次置换检验对模型进行内部验证, R^2 与 Q^2 均与纵轴相交($R^2=0.462$, $Q^2=-0.579$),且回归线斜率均大于0。丹膝颗粒给药组与MCAO组的OPLS-DA得分图完全分离,该模型 $R^2Y=0.485$, $Q^2=0.768$,表明模型预测能力较好,200次置换检验结果显示, R^2 与 Q^2 均与纵轴相交($R^2=0.377$, $Q^2=-0.601$),且回归线斜率均大于0。上述结果表明该模型预测能力良好,没有出现拟合现象。(见图2)

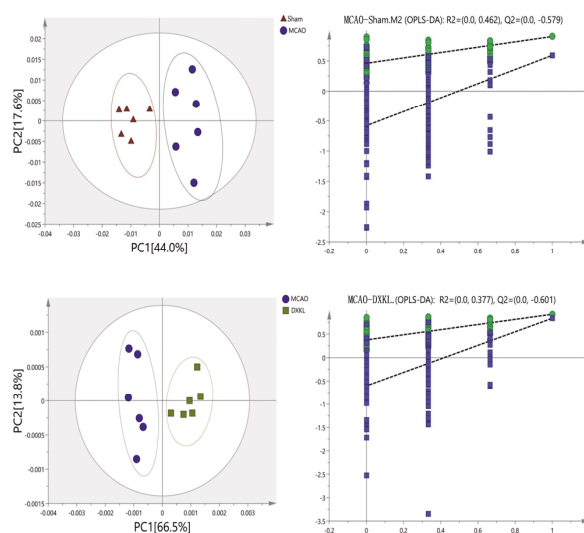


图2 各组间大鼠脑组织代谢物的OPLS-DA得分图及200次置换检验图

2.3 丹膝颗粒对MCAO大鼠脑组织代谢谱的差异代谢物分析 火山图可以直观展示组间代谢物差异的整体分布情况。根据VIP>1且P<0.05,使用火山图的形式表示出各个差异代谢物。如图3所示,在MCAO-Sham组中有12种代谢物发生变化,其中7个化合物上调,5个代谢物下调。(见表2)MCAO-DXKL组中有38种代谢差异物,其中22个化合物上调,16个下调。(见表3)其中MCAO-Sham组中有机氧化物、脂质和类脂质分子、有机酸及其衍生物各占25%;在MCAO-DXKL组中其他类占28.95%,有机酸及其衍生物占21.05%。(见图4)将MCAO-Sham组和MCAO-DXKL组交集,获得丹膝颗粒治疗MCAO大鼠的一种差异代谢物为L-天冬氨酸。

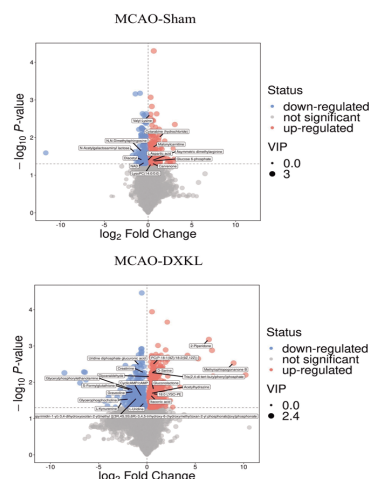


图 3 各组间大鼠脑组织差异代谢物火山图

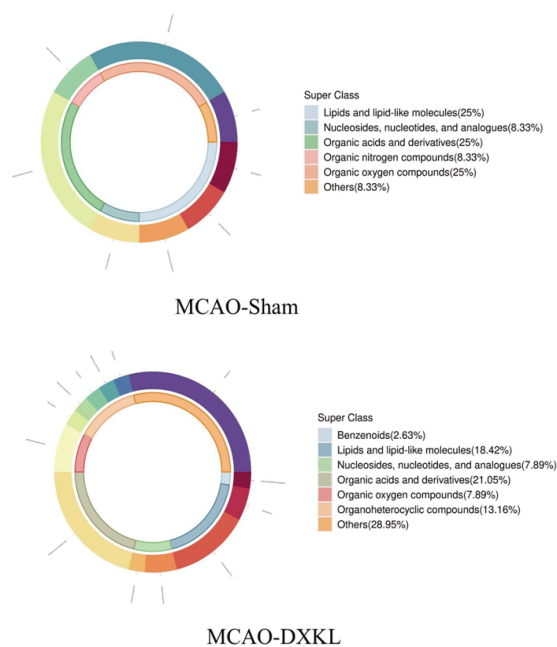


图 4 各组间大鼠脑组织差异代谢物饼图

表 2 MCAO-Sham 组脑组织差异代谢物的鉴定分析

代谢物	t_R /min	HMDB号	离子模式	VIP	P	FC	上调/下调
Cytarabine (hydrochloride)	1.58	/	POS	2.73	0.01	0.01	↑
Valyl-Lysine	5.11	HMDB0029132	POS	2.69	0.00	0.00	↑
L-Aspartic acid*	4.26	HMDB0000191	NEG	2.34	0.04	0.04	↓
Asymmetric dimethylarginine	4.80	HMDB0001539	POS	2.34	0.04	0.04	↑
LysoPC(14:0/0:0)	2.10	HMDB0010379	POS	2.29	0.05	0.05	↑
Malonylcarnitine	3.77	HMDB0002095	POS	2.28	0.02	0.02	↑
NAD	4.14	HMDB0000902	POS	2.24	0.05	0.05	↓
N,N-Dimethylsphingosine	0.54	HMDB0013645	POS	2.03	0.02	0.02	↓
Diacetyl	3.99	HMDB0003407	POS	1.87	0.04	0.04	↓
Canrenone	1.43	HMDB0003033	NEG	1.87	0.05	0.05	↑
Glucose 6-phosphate	4.47	HMDB0001401	POS	1.67	0.04	0.04	↑
N-Acetylgalactosaminyl lactose	4.17	HMDB0041622	POS	1.52	0.02	0.02	↓

注:*表示共有差异物; t_R 表示保留时间;POS表示正离子模式;NEG表示负离子模式;VIP表示变量重要性投影;FC表示差异倍数;↑表示上调;↓表示下调。

表 3 MCAO-DXKL 组脑组织差异代谢物的鉴定分析

代谢物	t_R /min	HMDB号	离子模式	VIP	P	FC	上调/下调
2-Piperidone	0.43	/	POS	2.34	0.00	0.80	↑
Methylphosphogonanone B	0.27	/	NEG	2.31	0.00	8.56	↑
Cytarabine	2.36	HMDB0015122	POS	2.03	0.04	1.41	↑
Itaconic acid	4.14	HMDB0002092	NEG	2.03	0.02	1.25	↑
gamma-Glutamylglutamic acid	4.58	HMDB0011737	POS	2.01	0.04	1.25	↑
L-Aspartic acid*	4.26	HMDB0000191	NEG	1.96	0.04	1.16	↑
Riboflavin	2.13	HMDB0000244	POS	1.93	0.04	1.48	↑
D-Serine	3.71	HMDB0003406	POS	1.92	0.01	1.40	↑
Uridine diphosphate glucuronic acid	4.45	HMDB0000935	NEG	1.92	0.00	0.59	↓
Graveoline	3.79	HMDB0033480	POS	1.92	0.02	0.39	↓
Glyceraldehyde	1.40	HMDB0001051	NEG	1.92	0.01	1.24	↑
18:0 LYSO-PE	2.05	/	POS	1.89	0.02	1.51	↑
S-Formylglutathione	3.79	HMDB0001550	POS	1.86	0.02	0.31	↓
Acetylhydrazine	3.09	HMDB0060428	POS	1.83	0.02	1.33	↑
Creatinine	1.39	HMDB0000562	POS	1.82	0.01	0.82	↓
Glycerolphosphorylethanolamine	3.83	HMDB0000114	POS	1.81	0.02	0.37	↓
Glycerophosphocholine	4.07	HMDB0000086	POS	1.79	0.03	0.27	↓
L-Serine	3.70	HMDB0000187	NEG	1.75	0.02	1.38	↑
2-O-Methylcytosine	1.85	HMDB0004339	POS	1.75	0.03	1.57	↑
Glycyl-L-Leucine	2.88	/	POS	1.70	0.04	0.45	↓
Gluconolactone	0.42	HMDB0000150	NEG	1.68	0.02	1.42	↑
Phosphocreatine	4.19	HMDB0001511	POS	1.68	0.02	1.69	↑
Cytidine	2.38	HMDB0000089	NEG	1.67	0.04	1.58	↑
Erythromycin Ethylsuccinate	1.94	/	NEG	1.64	0.05	0.50	↓
L-Kynurenine	2.69	HMDB0000684	POS	1.63	0.04	0.17	↓
[(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl	4.19	HMDB0060079	NEG	1.62	0.03	0.49	↓
[(3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl phosphonate]							
oxy]phosphonate							
PC[P-18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)]	0.64	HMDB0011310	POS	1.62	0.00	1.46	↑
5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine	0.59	/	POS	1.53	0.05	0.60	↓
CyclicAMP/cAMP	2.84	/	POS	1.53	0.02	0.69	↓
Gallic acid	1.15	HMDB0005807	NEG	1.51	0.05	0.52	↓
LysoPI(18:0/0:0)	2.54	HMDB0240261	POS	1.48	0.04	1.45	↑
3-Furoic acid	4.77	HMDB0000444	NEG	1.48	0.03	1.25	↑
Polyoxyethylene(600) monoricinoleate	2.53	HMDB0032476	POS	1.45	0.05	1.36	↑
PI[20:3(5Z,8Z,11Z)/18:1(11Z)]	1.95	HMDB0009881	POS	1.44	0.04	1.22	↑
L-Uridine	1.27	/	NEG	1.40	0.04	0.84	↓
Tris[2,4-di-tert-butylphenyl]phosphate	0.26	/	POS	1.40	0.01	1.34	↑
Kynurenic Acid	1.60	/	POS	1.38	0.05	0.24	↓
Kifunensine	1.38	/	POS	1.23	0.05	0.86	↓

注:*表示共有差异物; t_R 表示保留时间;POS表示正离子模式;NEG表示负离子模式;VIP表示变量重要性投影;FC表示差异倍数;↑表示上调;↓表示下调。

2.4 潜在生物标志物的调控以及代谢通路分析 将MCAO-DXKL 38种代谢差异物作为研究对象,导入MetaboAnalyst 5.0,

进行通路富分析,得到的代谢通路。根据 $P < 0.05$ 筛选,得到丹膝颗粒治疗主要与D-氨基酸代谢、醚脂质代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、核黄素代谢、甘油磷脂代谢、抗坏血酸和醛酸盐代谢相关。同时结合丹膝颗粒治疗MCAO大鼠的一种差异代谢物L-天冬氨酸所在的通路,进一步推测丹膝颗粒治疗缺血性脑卒中的作用机制可能与D-氨基酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢过程相关。(见图5)

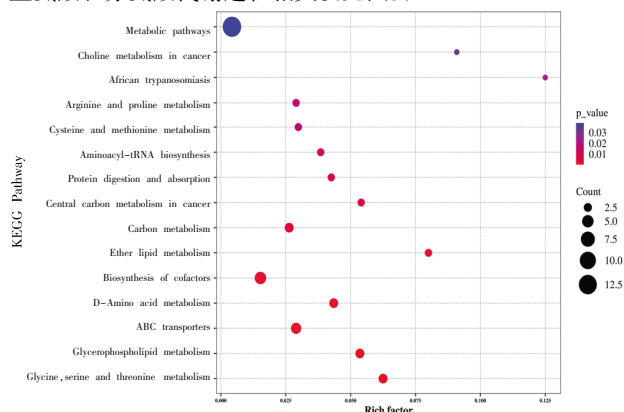


图5 MCAO-DXKL 代谢差异物 KEGG 通路分析气泡图

3 讨 论

脑卒中病因病机复杂,不同时期医家理论各异,从外因论渐转内因论,从一元化走向多元因素。金、元代前多持外风致病说^[11],元代王履提“真中风”“类中风”概念^[12];明清认可“非风”观点,认识到卒中发病有标本之分,本为阴阳两虚等,标为脏腑、风痰等所致^[13-14];明清后确立“内风致病”观,近现代从风、痰、火、虚、气阐释病机。历代医家对病位认识不一,《黄帝内经》载在“上”“头”等,后觉与脑、脏腑经络相关,随中西医结合发展,愈发明确其与解剖学脑关系密切^[15]。现代医学对缺血性脑卒中发病机制的认知主因为动脉粥样硬化、动脉炎、外伤致脑血管病变形斑块堵塞^[16],或房颤等心血管病栓子入血阻塞脑部血管,损伤机制与细胞内钙超载、氧化应激、炎症反应等相关^[16-18];近年来发现铁死亡也是缺血性脑卒中的重要分子机制之一,铁死亡与缺血性脑卒中的病理过程密切相关^[19-22]。

丹膝颗粒由丹参、牛膝、天麻、牡丹皮、赤芍、川芎、生地、黄、淫羊藿、桑寄生、栀子、决明子、火麻仁共12味药材组成,具有养阴平肝、息风通络、清热除烦的功效,临床上用于中风病中经络恢复期瘀血阻络兼肾虚证。丹膝颗粒中不同药味均具有治疗缺血性脑卒中的作用。丹参中丹参素能够改善心肌梗死,抑制细胞凋亡^[23-24]。牛膝多肽可促进MCAO大鼠的恢复,改善脑损伤,通过PI3K/Akt减轻LPS激活小胶质细胞的细胞毒性,通过Nrf2抑制LPS刺激的BV2小胶质细胞产生的神经炎症^[25-26]。但目前对丹膝颗粒复方治疗缺血性脑卒中的机制研究较缺乏。本实验研究发现丹膝颗粒在治疗MCAO大鼠方面具有显著效果。从神经功能评分结果来看,丹膝颗粒给药组能显著降低MCAO大鼠的神经功能评分,表明其能够有效改善缺血性脑卒中神经功能损伤。这一结果与本课题组前期研究基础以及丹膝颗粒在临床上对中风患者症状改善的观察相

吻合,进一步证实了其在神经系统中具有保护作用。

在代谢组学研究中,主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果显示,Sham组、MCAO组和丹膝颗粒给药组之间的代谢谱存在明显差异,且模型预测能力良好,未出现过拟合现象。这表明MCAO大鼠的脑组织较正常组大鼠代谢发生了显著改变,而在丹膝颗粒干预下能够对这种代谢紊乱产生调节作用。通过对差异代谢物的分析,我们发现MCAO-Sham组有12种差异代谢物,MCAO-DXKL组有38种代谢差异物,其中共有差异代谢物为L-天冬氨酸。差异代谢物结果表明丹膝颗粒治疗后能显著回调L-天冬氨酸发生紊乱的代谢物水平,提示丹膝颗粒可能通过调节L-天冬氨酸相关代谢途径来发挥治疗作用。L-天冬氨酸作为一种重要的氨基酸,在多种生理过程中发挥作用,其代谢紊乱可能与缺血性脑卒中的病理生理过程密切相关。对MCAO-DXKL组中38种代谢差异物进行KEGG通路富集分析,进一步结合差异代谢物L-天冬氨酸所在通路,推测丹膝颗粒治疗缺血性脑卒中的作用机制可能与D-氨基酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等过程有关。D-氨基酸代谢在神经递质合成、细胞信号传导等方面具有重要意义,丹膝颗粒对其代谢的调节可能有助于恢复受损的神经功能。半胱氨酸和蛋氨酸代谢参与抗氧化过程和甲基化反应,缺血性脑卒中时氧化应激增强。丹膝颗粒可能通过调节该代谢途径增强抗氧化能力,减轻氧化损伤。甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢与神经保护、能量代谢等相关,这些都提示丹膝颗粒对脑卒中的干预治疗可能与提供能量支持、提高抗氧化能力、促进神经修复有关。

然而,本研究仍存在一定局限性。虽然代谢组学技术能够提供关于生物体内代谢变化的整体信息,但它只是一种间接反映生物学过程的方法,对于丹膝颗粒具体作用于哪些靶点以及如何调节代谢通路中的关键酶等分子机制仍需进一步深入研究。未来研究可以进一步扩大样本量,采用多种研究方法相结合,如转录组学、蛋白质组学等,从不同层面全面解析丹膝颗粒治疗缺血性脑卒中的作用机制,为其临床应用提供更坚实的理论基础。

参考文献

- [1] BENJAMIN E J, BLAHA M J, CHIUVE S E, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: A report from the American heart association[J]. Circulation, 2017, 135(10): e146-e603.
- [2] 《中国脑卒中防治报告2021》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2023, 20(11): 783-793.
- [3] 刘兰, 王为珍, 王乔树. 大动脉粥样硬化型缺血性卒中易感基因研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2018, 18(4): 278-283.
- [4] ZHU H, HU S, LI Y, et al. Interleukins and ischemic stroke[J]. Front Immunol, 2022, 13: 828447.
- [5] DELONG J H, OHASHI S N, O'CONNOR K C, et al. Inflammatory responses after ischemic stroke[J]. Semin

- Immunopathol, 2022, 44(5):625-648.
- [6] FARINA M, VIEIRA L E, BUTTARI B, et al. The Nrf2 pathway in ischemic stroke: A review[J]. *Molecules*, 2021, 26(16):5001.
- [7] 皮桂芳, 刘梨.《黄帝内经》在脑卒中患者情志护理中的应用[J]. *中国社区医师*, 2020, 36(35):92-93.
- [8] 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, 2020:719.
- [9] 喻长远, 田永立. 丹藤颗粒对大鼠及沙土鼠局灶性脑血管损伤的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005, 11(9):670-672.
- [10] 陈超, 聂郁林, 陆心恬, 等. 改良线栓法建立SD大鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J]. *神经损伤与功能重建*, 2023, 18(10):569-573.
- [11] 李红香. 基于中医文献的中风病研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [12] 喻腾云, 谢钰汝, 黄琴. 真中风与类中风概念分类浅述[J]. *中国民族民间医药*, 2015, 24(15):44-45.
- [13] 林震溪. 张景岳非风学说的理论研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [14] 徐娜, 杨宇峰. 历代医家论中风病之因机理论框架[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(3):75-77.
- [15] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5):227-240.
- [16] 张奎明, 崔应麟, 葛鸾蝶, 等. 基于“病理-方证”探讨康益胶囊治疗缺血性脑卒中的机制[J]. *中华全科医学*, 2022, 20(2):307-310.
- [17] ZHU H M, WANG Z Q, YU J X, et al. Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 178:101610.
- [18] 郭佩鑫, 邹伟. 出血性脑卒中与细胞焦亡相关研究进展[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(34):61-64.
- [19] QIN J, YANG X, ZHANG X, et al. Monocyte mediated brain targeting delivery of macromolecular drug for the therapy of depression[J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(2):391-400.
- [20] 杨恋, 陈伟. 长春西汀与胞二磷胆碱治疗脑梗死的临床效果[J]. *慢性病学杂志*, 2023, 24(1):62-64.
- [21] FORRESTER S J, KIKUCHI D S, HERNANDES M S, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling[J]. *Circ Res*, 2018, 122(6):877-902.
- [22] 李家正, 秦文秀, 许军峰. 中医药抑制铁死亡在缺血性脑卒中防治中的研究进展[J]. *中医药导报*, 2024, 30(8):98-102.
- [23] GUO C, YIN Y, DUAN J L, et al. Neuroprotective effect and underlying mechanism of sodium danshensu [3-(3, 4-dihydroxyphenyl) lactic acid from *Radix and Rhizoma Salviae miltiorrhizae* = Danshen] against cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(2):283-289.
- [24] 韩晓娟, 陈礴, 侯海文. SIRT1/TLR4/NF- κ B在丹参素治疗大鼠心肌梗死的保护作用[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(4):443-445.
- [25] 毛平, 夏卉莉, 袁秀荣, 等. 怀牛膝多糖抗凝血作用实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(12):1075-1076.
- [26] CHENG Q, SHEN Y T, CHENG Z H, et al. *Achyranthes bidentata* polypeptide k suppresses neuroinflammation in BV2 microglia through Nrf2-dependent mechanism[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(20):575.
- (收稿日期:2024-10-26 编辑:时格格)

(上接第54页) 2017, 33(1):139-142.

- [16] 姚敏, 王芹, 潘红玲, 等. 针刺治疗卵巢早衰及对患者细胞因子TNF- α 、IFN- γ 表达水平的影响[J]. *中国针灸*, 2019, 39(11):1181-1184.
- [17] 薛岩岩, 王铁蓉. 早发性卵巢功能不全中西医发病机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(1):204-207.
- [18] XIONG J, TAN R, WANG W, et al. Evaluation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and FOXP3 mRNA in premature ovarian insufficiency[J]. *Climacteric*, 2020, 23(3):267-272.
- [19] 鲁佳琳. 早发性卵巢功能不全患者外周血IL-10、IL-17与TGF- β 1与不同中医分型的相关性[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [20] 朱春兰, 夏亦冬. 中药结合激素替代疗法治疗卵巢早衰研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(10):92-95.
- [21] 黄小琼. 归肾丸对免疫性卵巢早衰小鼠的治疗作用和机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [22] 江二喜. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠血清性激素及IL-6、IL-17水平的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(8):909-912.
- [23] 许万枫, 苏洁, 翁路安, 等. 孕康口服液对早发性卵巢功能不全小鼠的影响[J]. *中成药*, 2020, 42(5):1180-1186.
- (收稿日期:2024-10-09 编辑:罗英姣)