

龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响及代谢组学研究[△]

孙晓丽^{1,2*}, 张镨斌³, 付帮泽¹, 郭淑贞², 王伟^{2,4#}(1.北京城市学院生物医学部,北京 100094;2.北京中医药大学中医学学院,北京 100029;3.北京厚成医药科技开发有限公司,北京 100044;4.广州中医药大学,广州 510006)

中图分类号 R965;R971 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1094-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.12



摘要 目的 研究龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习和记忆能力的影响,并基于代谢组学探讨其可能的作用机制。方法 90只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、甲磺酸双氢麦角毒碱片组(阳性对照,0.54 mg/kg)和龙生蛭胶囊高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g/kg),每组15只大鼠。除假手术组外(只穿线不结扎),各组大鼠采用双侧颈总动脉永久结扎方法制备血管性痴呆模型,并连续灌胃给药28 d。采用Morris水迷宫实验测定大鼠的学习和记忆能力,采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑海马区组织病理变化,检测大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平的变化。采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术分析血清代谢图谱,以多元统计分析方法筛选出差异常代谢物,并进行代谢通路富集分析。结果 Morris水迷宫实验结果显示,与模型组比较,各给药组大鼠的逃避潜伏期显著缩短、穿越平台次数显著增加、在目标象限停留时间显著延长($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。血清生化指标检测结果显示,与模型组比较,甲磺酸双氢麦角毒碱片组和龙生蛭胶囊高剂量组大鼠血清SOD水平显著升高,各给药组大鼠血清GSH-Px水平显著升高,MDA水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。HE染色结果显示,龙生蛭胶囊能够改善血管性痴呆模型大鼠脑海马区组织病理损伤。通过UPLC-Q-TOF-MS技术分析和正交偏最小二乘判别分析模型,共筛选鉴定出14种差异代谢物(变量投影重要性 >1 且 $P<0.05$)。代谢通路富集分析结果显示,大鼠血管性痴呆涉及的代谢通路主要有维生素B₆代谢、脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成。结论 龙生蛭胶囊对血管性痴呆所致大鼠学习和记忆能力下降具有一定的改善作用,其作用可能与改善血管性痴呆发生过程中脂质堆积造成的氧化应激损伤有关,涉及的代谢通路主要有维生素B₆代谢、脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成。

关键词 龙生蛭胶囊;血管性痴呆;学习能力;记忆能力;代谢组学;大鼠

Effects of Longshengzhi capsule on learning and memory ability of vascular dementia model rats and study on its metabonomics

SUN Xiaoli^{1,2}, ZHANG Kaibin³, FU Bangze¹, GUO Shuzhen², WANG Wei^{2,4}(1. School of Biological Medicine, Beijing City University, Beijing 100094, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Beijing Houcheng Medical Technology Co., Ltd., Beijing 100044, China; 4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effect of Longshengzhi capsule on learning and memory ability of vascular dementia model rats and explore its mechanism based on metabonomics. **METHODS** Totally 90 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Dihydroergotoxin mesylate tablet group (positive control, 0.54 mg/kg), Longshengzhi capsule high-dose, medium-dose and low-dose groups (2.16, 1.08 and 0.54 g/kg), with 15 rats in each group. In addition to sham operation group (only threading without ligation), the vascular dementia model was prepared by permanent ligation of bilateral common carotid arteries in each group, which was administered by gavage for 28 d. Morris water maze test was used to determine the learning and memory ability of rats; hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of hippocampus; the serum levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected; the serum metabolic map was analyzed by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS), the specific metabolites were screened by multivariate statistical analysis, and the metabolic pathway was enriched and analyzed. **RESULTS** Morris water maze test showed that compared with model group, the

[△] 基金项目:北京城市学院“城市新星计划”训练项目(No.202111418015)

* 讲师,硕士生导师,博士。研究方向:心脑血管药理学、中药新药。电话:010-82476537-8180。E-mail:sdxhli@126.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:心脑血管药理学。电话:010-64286283。E-mail:wangweibucm@163.com

escape latency of rats in each administration group was significantly shortened, the number of crossing the platform was significantly increased, and the residence time in the target quadrant was significantly prolonged ($P<0.01$ or $P<0.05$). The results of serum biochemical indexes showed that compared with model group, the serum level of SOD

increased significantly in Dihydroergotoxine mesylate tablet group and Longshengzhi capsule high-dose group, the serum level of GSH-Px increased significantly while the MDA level decreased significantly in each administration group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining showed that Longshengzhi capsule could improve the histopathological damage of hippocampus in vascular dementia model rats. A total of 14 differential metabolites were screened and identified by UPLC-Q/TOF-MS and orthogonal partial least squares discriminant analysis model ($VIP > 1$ and $P < 0.05$). The results of metabolic pathway enrichment analysis showed that the metabolic pathways involved in vascular dementia in rats mainly included vitamin B₆ metabolism, fatty acid metabolism and steroid hormone biosynthesis. **CONCLUSIONS** Longshengzhi capsule can improve the learning and memory ability of rats caused by vascular dementia. Its effect may be related to improving the oxidative stress injury caused by lipid accumulation in the process of vascular dementia. The metabolic pathways involved mainly include vitamin B₆ metabolism, fatty acid metabolism and steroid hormone biosynthesis.

KEYWORDS Longshengzhi capsule; vascular dementia; learning ability; memory ability; metabolomics; rat

痴呆是一种老年群体常见病,以获得性认知功能减退为主要表现。随着全球人口老龄化的增加,该病已成为严重影响人类健康的重大问题^[1]。我国痴呆的患病率为5%左右,且呈逐年增加的趋势^[2]。血管性痴呆是老年痴呆的常见类型之一,目前已成为导致痴呆的第二大病因^[3]。血管性痴呆通常由出血性脑血管病、缺血性脑血管病及急慢性缺氧性脑血管病等疾病引起,可分为多梗死性痴呆、皮质下动脉硬化性脑病、关键部位梗死性痴呆、分水岭梗死性痴呆、出血性痴呆,且易造成认知功能障碍^[4-5]。

龙生蛭胶囊于2001年在中国获批上市,由黄芪、水蛭、川芎等12味中药组成,在补阳还五汤的基础上经过处方加减而成,对脑卒中具有较好疗效^[6-7]。有研究报道,在临床上龙生蛭胶囊联合西药对血管性痴呆也有一定的治疗作用^[8],但是关于龙生蛭胶囊单独使用是否能够治疗血管性痴呆,笔者查阅文献未见报道。本实验通过制备大鼠血管性痴呆模型,探讨龙生蛭胶囊给药后对模型大鼠学习和记忆能力的影响,并通过代谢组学研究探讨可能的作用机制,以期为龙生蛭胶囊的临床应用及二次开发研究提供数据支撑。

1 材料

1.1 动物

健康雄性SPF级SD大鼠,体质量220 g左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。实验符合北京中医药大学动物伦理委员会标准,伦理号:BuCM-4-2018121802-4063。

1.2 仪器

Morris水迷宫购自北京众实科技有限公司;ACQUITY UPLC I-Class型超高效液相色谱仪、SYNAPT G2-Si型质谱仪购自美国Waters公司;Neofuge 15R高速冷冻离心机购自上海力康生物医疗科技控股有限公司;Chemray 240型全自动生化分析仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;RM2016型病理切片机购自上海徠卡仪器有限公司。

1.3 药物与试剂

龙生蛭胶囊(批号20171250,规格0.4 g/粒)购自陕西步长制药有限公司;甲磺酸双氢麦角毒碱片(批号7M801T,规格1 mg/片)购自天津华津制药厂;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号分别为20180412、20180418、20180908)购自南京建成生物工程研究所;苏木素-伊红(HE)染色液、4%多聚甲醛(批号分别为G1005、G1101)购自武汉谷歌生物科技有限公司;乙腈(色谱级,货号A998-4)购自上海佰晔生物科技中心。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取90只SD大鼠,按照随机数字表法随机分为假手术组、模型组、甲磺酸双氢麦角毒碱片组(阳性对照,0.54 mg/kg)和龙生蛭胶囊高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g/kg),每组15只大鼠。参考《中药药理研究方法学》^[9],依据成人给药量换算得到大鼠给药量作为甲磺酸双氢麦角毒碱片组和龙生蛭胶囊中剂量组的给药剂量,龙生蛭胶囊高、低剂量组的给药剂量为中剂量组的2倍、1/2。除假手术组外(只穿线不结扎),其余各组大鼠采用双侧颈总动脉永久结扎方法制备血管性痴呆模型^[10]。造模后第3天,参考文献[11]进行Morris水迷宫行为学测评,以假手术组大鼠逃避潜伏期为参考值,计算其余各组大鼠的逃避潜伏期与参考值之比,若该比值 $> 20\%$,则被评定为有认知功能障碍的大鼠,即造模成功。每组至少选取10只大鼠进入后续实验。甲磺酸双氢麦角毒碱片组和龙生蛭胶囊高、中、低剂量组大鼠分别灌胃相应剂量的药物混悬液10 mL/kg,假手术组和模型组大鼠灌胃相同体积的蒸馏水,均连续灌胃28 d。

2.2 Morris水迷宫实验

参考文献[12-13],于大鼠灌胃最后7 d期间进行Morris水迷宫实验,检测各组大鼠学习和记忆能力的变化情况,包括定位航行实验和空间探索实验。

2.2.1 定位航行实验 设置水温(23±2)℃,并将水池分为A、B、C、D 4个象限,将各组大鼠按象限顺序依次面向池壁放入水中,记录大鼠120 s内成功爬上平台所需要的时间(大鼠找到平台并停留其上的时间≥5 s为成功),即逃避潜伏期;若大鼠超过120 s仍未找到平台,则引导其至平台位置,并使其在平台上停留时间≥10 s后放回笼中,该类大鼠逃避潜伏期记为120 s。训练第1天每只大鼠进行120 s游泳训练,适应实验环境。随后进行连续4 d的定位航行学习训练,每只大鼠每天训练4次,早晚各2次,每次不同象限测定时间间隔为30 min。第6天进行正式测试,取4个象限逃避潜伏期时间的均值作为大鼠学习能力的检测指标。

2.2.2 空间探索实验 定位航行实验完成后次日,移除实验平台,从目标象限间隔距离最大的位置放入大鼠,大鼠在无站台作为目标的前提下,凭借记忆搜索站台。期间采用摄像机观察记录大鼠在120 s内的游泳活动路线,应用Image Pro Plus系统分析大鼠进入目标象限的次数,将大鼠穿越平台次数、在目标象限停留时间作为记忆能力的检测指标。

2.3 血清生化指标检测

待连续灌胃28 d后,取大鼠腹主动脉血,以4 000 r/min离心处理2次,每次15 min,取上清液,参照试剂盒说明书检测血清中SOD、MDA、GSH-Px水平。

2.4 脑组织病理学观察

待连续灌胃28 d后,在取大鼠腹主动脉血后,采用4%多聚甲醛灌注,解剖取脑组织,置于4%多聚甲醛中固定并制备石蜡切片,进行HE染色,显微镜下观察大鼠脑海马区组织的病理变化。

2.5 血清代谢组学分析

2.5.1 样品制备 待连续灌胃28 d后,取大鼠腹主动脉血,以4 000 r/min离心15 min;取上层血清100 μL,加入300 μL乙腈,冰水浴超声10 min,涡旋混匀1 min,以13 000 r/min在4℃离心15 min,取上清液作为检测样品备用。

各吸取10 μL上述方法制备的血清样品于离心管中,混合涡旋1 min,以13 000 r/min在4℃离心10 min,取上清液作为质控样品,平行处理6份用于测样过程中的质量检测与方法学考察。

2.5.2 色谱条件 色谱柱采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流速为0.3 mL/min,柱温为40℃,进样量为5 μL,以0.1%甲酸水溶液(A相)-0.1%甲酸乙腈溶液(B相)为流动相进行梯度洗脱(0~0.5 min, 99% A; 0.5~2 min, 99% A→50% A; 2~9 min, 50% A→1% A; 9~10 min, 1% A; 10~10.5 min, 1% A→99% A; 10.5~12 min, 99% A)。

2.5.3 质谱条件 采用电喷雾电离源,在正、负离子模

式下进行质谱检测分析。使用高纯氮气作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体,干燥气流速为10 mL/min,雾化气压为310 kPa,氮气温度为350℃,氮气流速为600 L/h,锥孔反吹氮气流速为50 L/h;毛细管电离电压为2.1 kV,四极杆扫描范围为 m/z 50~1 000 Da。

2.5.4 质量检测与方法学考察 通过制备质控样品进行考察,以保证仪器检测的稳定性。取同一质控样品溶液连续进样6次,平行制备6份质控样品,再取同一质控样品溶液分别在0、6、12、18、24 h进样分析后,随机选取20个色谱峰,计算色谱峰峰面积和保留时间的RSD值,确定仪器精密度、方法精密度、样品稳定性。

2.5.5 血清代谢组学数据处理 将UPLC-Q-TOF/MS技术分析数据导入Simca 14.1软件,首先进行无监督的主成分分析(principal component analysis, PCA),根据95% CI观察有无异常数据;剔除离群值后,进行有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA),并进行200次的置换检验,以 R^2 和 Q^2 的截距评判数据是否过拟合,确定模型的可靠性。

2.5.6 差异代谢物的筛选 将变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)>1的峰列表导入SPSS 22.0软件进行统计分析,采用Kolmogorov-Smirnov检验判断数据是否呈正态分布,符合正态分布的数据按照方差齐性进行 t 检验或近似 t 检验,不符合正态分布的数据进行Kruskal-Wallis非参数秩和检验。当VIP>1且 $P<0.05$,代谢物视为差异代谢物。依据Progenesis QI软件和网络开源数据库(METLIN、HMDB)匹配及文献比对,对差异代谢物进行鉴定。

2.5.7 代谢通路富集分析 运用MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)网络分析平台对组间差异代谢物进行拓扑分析。以模型组和假手术组对比、各给药组和模型组对比,所鉴定的差异代谢物为研究对象,以 $P<0.05$ 为筛选条件进行代谢通路富集分析。

3 结果

3.1 龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习和记忆能力的影响

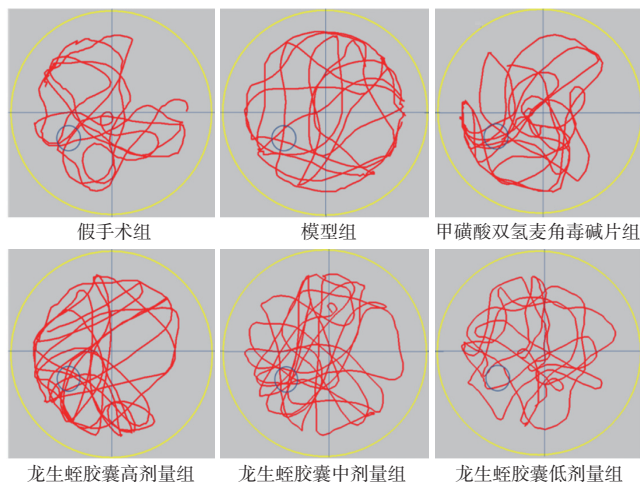
与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少、在目标象限停留时间显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠逃避潜伏期显著缩短、穿越平台次数显著增加、在目标象限停留时间显著延长($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果见表1。

训练第5天各组大鼠的运动轨迹示例图见图1。由图1可知,假手术组大鼠运动轨迹停留在目标象限较多,且多次穿越平台位置;模型组大鼠在目标象限停留轨迹较少;各给药组大鼠与模型组比较,运动轨迹多集中在目标象限,且多次停留在平台位置。

表1 各组大鼠学习和记忆能力比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	在目标象限停留时间/s
假手术组	19.2±12.7	5.9±1.4	37.3±8.1
模型组	59.1±29.7 ^a	2.3±0.9 ^a	25.9±4.7 ^a
甲磺酸双氢麦角毒碱片组	24.7±23.1 ^b	4.8±1.4 ^c	33.2±6.6 ^c
龙生蛭胶囊高剂量组	27.1±7.9 ^c	4.2±1.8 ^c	32.2±7.5 ^c
龙生蛭胶囊中剂量组	31.8±25.3 ^b	3.8±1.5 ^b	31.9±4.4 ^b
龙生蛭胶囊低剂量组	37.2±10.4 ^b	3.7±1.7 ^b	31.3±5.2 ^b

a: 与假手术组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与模型组比较, $P<0.01$

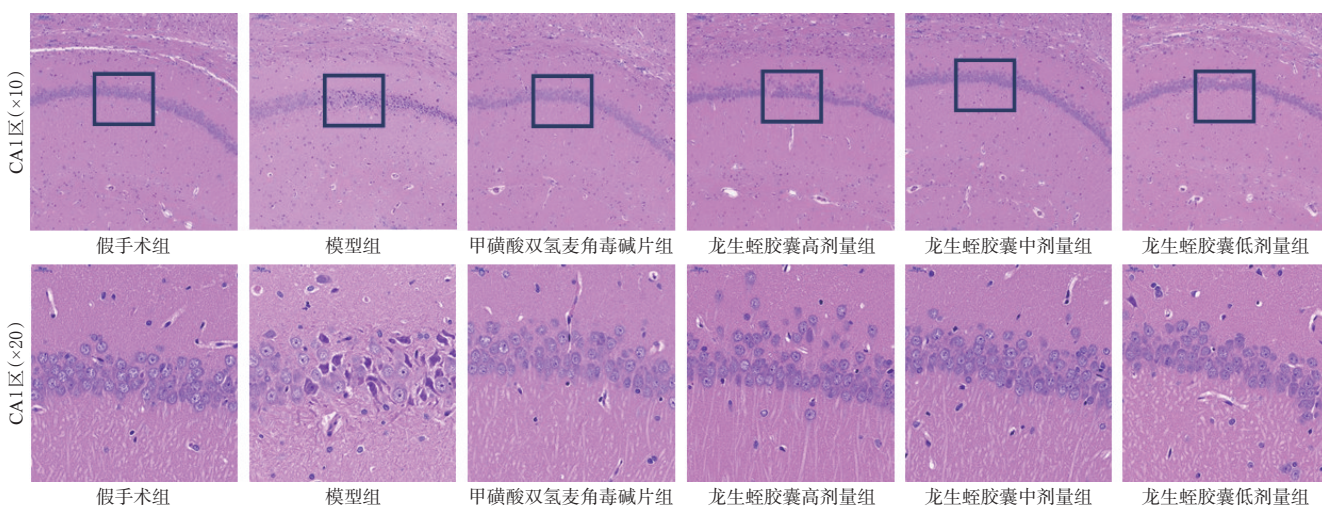


蓝色圆圈: 平台; 红色线条: 大鼠的运动轨迹; 黄色圆圈: Morris 水迷宫的范围

图1 训练第6天各组大鼠的运动轨迹示例图

3.2 龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠血清生化指标的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 水平显著降低、MDA 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 甲磺酸双氢麦角毒碱片组和龙生蛭胶囊高剂量组大鼠血清中 SOD 水平显著升高, 各给药组大鼠血清中 GSH-Px 水平显著升高、MDA 水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。



方框: 放大20倍的区域

图2 各组大鼠脑海马区 HE 染色显微图

表2 各组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/mL)
假手术组	645.39±70.14	5.14±0.74	906.86±180.24
模型组	571.47±38.72 ^a	6.34±1.06 ^a	644.57±189.73 ^b
甲磺酸双氢麦角毒碱片组	724.30±48.83 ^c	5.27±1.05 ^d	949.29±264.14 ^d
龙生蛭胶囊高剂量组	614.90±42.54 ^d	5.27±0.56 ^d	862.29±118.78 ^c
龙生蛭胶囊中剂量组	604.03±81.41	5.08±0.96 ^d	799.86±136.32 ^d
龙生蛭胶囊低剂量组	593.95±112.13	5.17±0.71 ^d	838.21±163.46 ^d

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与假手术组比较, $P<0.01$; c: 与模型组比较, $P<0.01$; d: 与模型组比较, $P<0.05$

3.3 脑组织病理学观察结果

HE 染色结果显示, 假手术组大鼠脑海马 CA1 区结构正常, 神经元细胞排列紧密, 细胞结构清晰; 模型组大鼠脑海马 CA1 区结构异常, 神经元细胞数量减少, 部分神经元细胞排列紊乱; 甲磺酸双氢麦角毒碱片组和龙生蛭胶囊高、中剂量组大鼠脑海马 CA1 区结构正常, 神经元细胞排列整齐; 龙生蛭胶囊低剂量组大鼠脑海马 CA1 区部分神经元细胞排列基本整齐, 无明显紊乱。结果见图2。

3.4 代谢图谱分析结果

UPLC-Q-TOF/MS 技术分析结果显示, 样品色谱图中随机选取的 20 个色谱峰保留时间的 RSD 均小于 3%, 峰面积的 RSD 均小于 15%, 表明仪器精密度和样品稳定性均良好。血清质控样品在正、负离子模式下的基峰强度(BPI)见图3。

3.5 血清代谢组学数据处理结果

本实验建立的 OPLS-DA 模型中, R^2 和 Q^2 均符合要求, 表明模型的可解释度与预测能力良好, 可用于进一步的数据分析。对样品进行 PCA 和 OPLS-DA, 结果发现造模和给药不同阶段各组大鼠代谢物分离良好, 存在显著的差异代谢物, 说明给药后导致了大鼠体内的内源性代谢物发生变化, 且各给药组和模型组在代谢水平方面有显著差异。结果见图4。

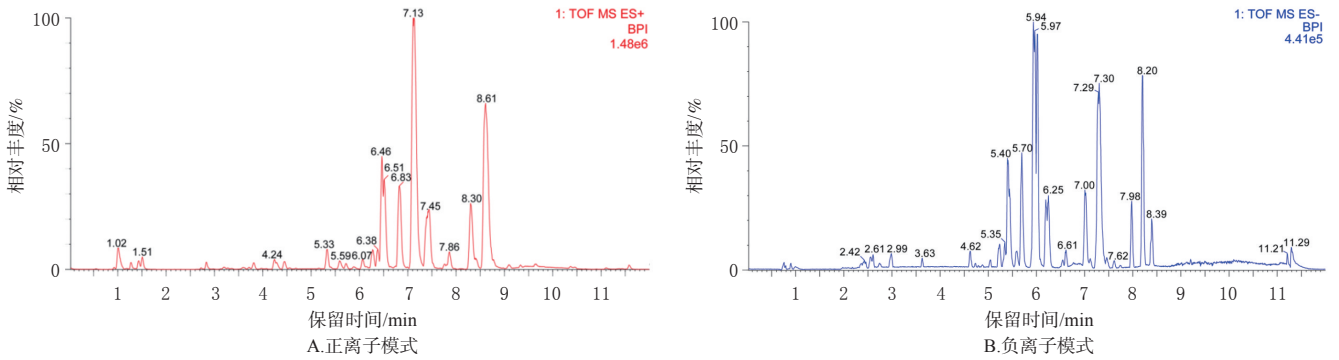
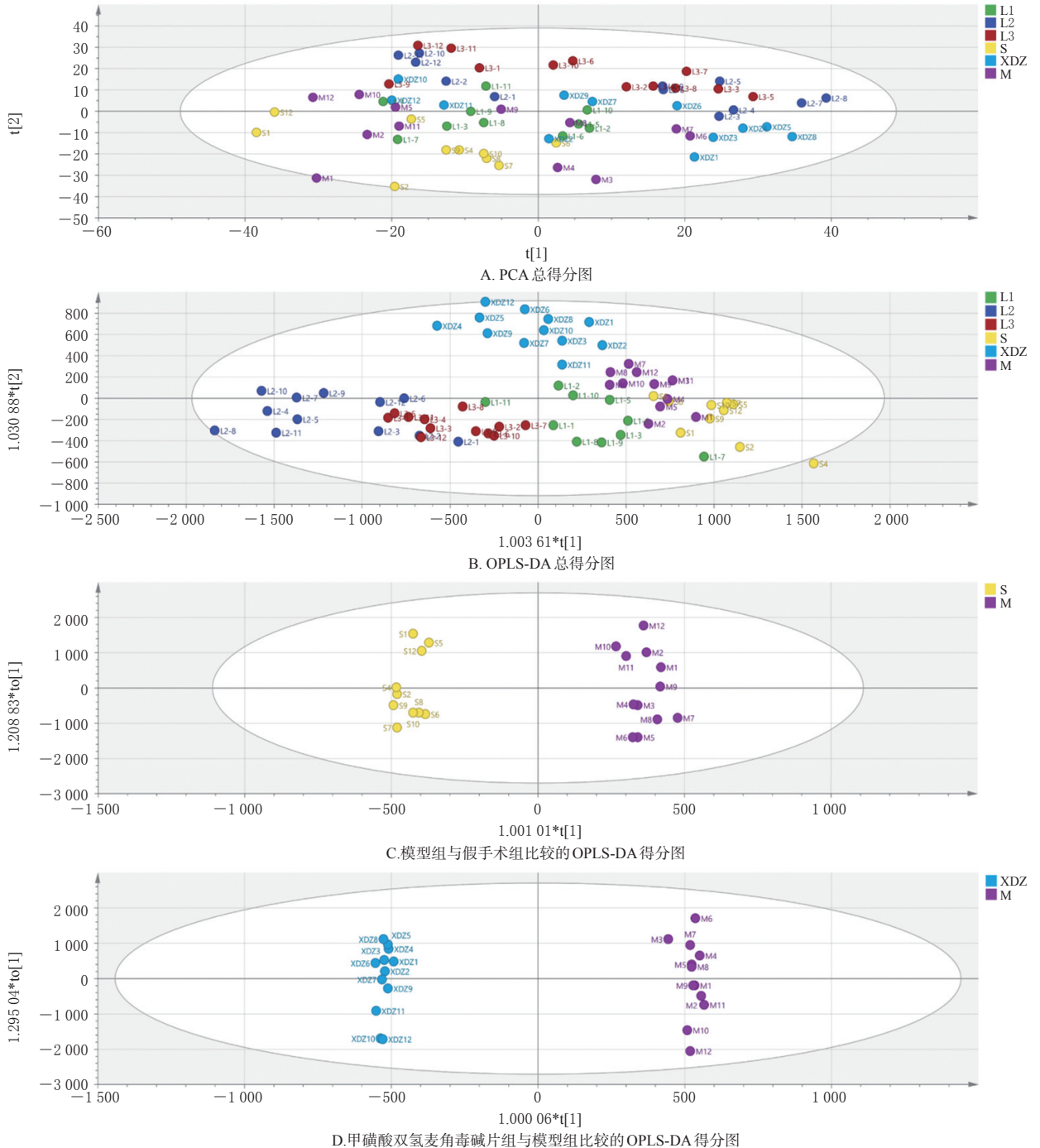
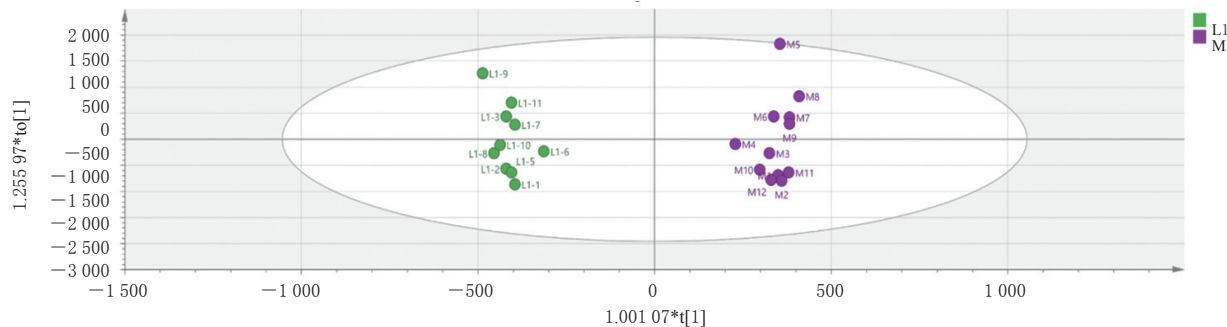


图3 正、负离子模式下大鼠血清质谱样品BPI图

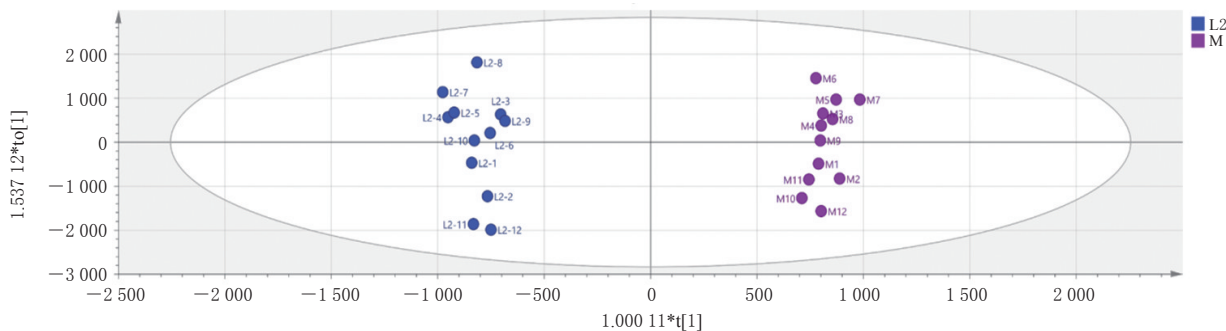


S:假手术组;M:模型组;XDZ:甲磺酸双氢麦角毒碱片组;L1:龙生蛭胶囊高剂量组;L2:龙生蛭胶囊中剂量组;L3:龙生蛭胶囊低剂量组

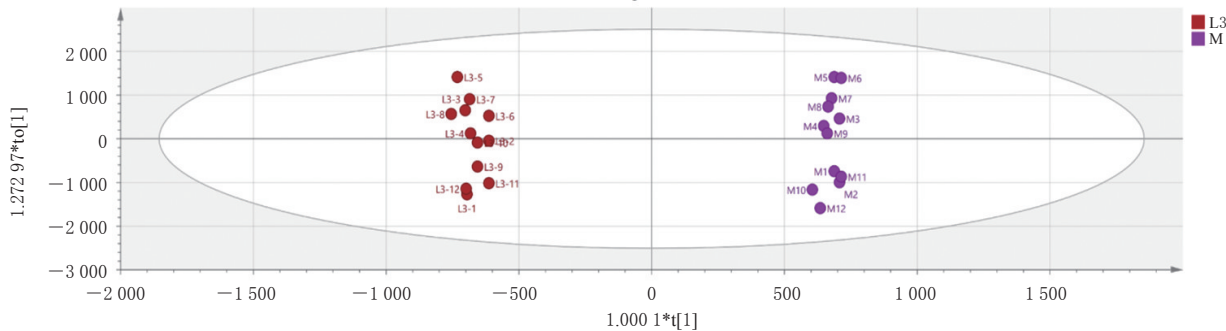
图4 大鼠血清代谢组学分析的PCA和OPLS-DA得分图



E.龙生蛭胶囊高剂量组与模型组比较的OPLS-DA得分图



F.龙生蛭胶囊中剂量组与模型组比较的OPLS-DA得分图



G.龙生蛭胶囊低剂量组与模型组比较的OPLS-DA得分图

续图4

3.6 差异代谢物的筛选结果

依据 OPLS-DA 模型,以 $VIP > 1$ 为标准筛选变量,模型组与假手术组比较得到 192 种代谢物,甲磺酸双氢麦角毒碱片组与模型组比较得到 168 种代谢物,龙生蛭胶囊高剂量组与模型组比较得到 196 种代谢物,龙生蛭胶囊中剂量组与模型组比较得到 119 种代谢物,龙生蛭胶囊低剂量组与模型组比较得到 163 种代谢物。再将数据导入 SPSS 22.0 软件进行统计分析,从 234 种代谢物中最终鉴定出 14 种差异代谢物($VIP > 1$ 且 $P < 0.05$)。对这 14 种差异代谢物的变化趋势进行分析显示,模型组与假手术组比较有 14 种差异代谢物;甲磺酸双氢麦角毒碱片组与模型组比较有 8 种差异代谢物;龙生蛭胶囊高剂量组与模型组比较有 2 种差异代谢物;龙生蛭胶囊中剂量组与模型组比较有 13 种差异代谢物;龙生蛭胶囊低剂量组与模型组比较有 13 种差异代谢物。结果见表 3。

表 3 各组大鼠血清差异代谢物的变化

序号	差异代谢物	甲磺酸双	龙生蛭胶	龙生蛭胶	龙生蛭胶
		模型组与 假手术组	氢麦角毒 碱片组与 模型组	囊高剂量 组与模型 组	囊中剂量 组与模型 组
1	磷脂酰胆碱	↑ ^a	↑ ^c	↑	↑ ^d
2	4-吡哆酸	↑ ^b	↓ ^c	↓	↑ ^d
3	四氢皮质甾酮	↓ ^b	↓ ^d	↓ ^d	↓ ^d
4	脱氧胆酸	↓ ^a	↑	↑	↑
5	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/20:2)	↓ ^a	↑ ^c	↑	↑ ^d
6	胆酸	↓ ^b	↓ ^d	↑ ^d	↓ ^d
7	溶血磷脂酰乙醇胺(18:0/0:0)	↓ ^b	↑ ^c	↑	↑ ^d
8	硬脂酸	↓ ^b	↓	↑	↑ ^d
9	磷脂酰丝氨酸	↓ ^b	↓ ^c	↑	↓ ^d
10	十二烷酸己酯	↓ ^b	↑	↑	↑ ^d
11	溶血磷脂酰乙醇胺(0:0/22:1)	↓ ^b	↑	↑	↑ ^d
12	溶血磷脂	↓ ^b	↓ ^c	↑	↑ ^d
13	辛酸乙酸芳樟酯	↓ ^a	↑	↑	↑ ^d
14	溶血磷脂酰乙醇胺(22:0/0:0)	↓ ^b	↓	↑	↑ ^d

a:与假手术组比较, $P < 0.05$;b:与假手术组比较, $P < 0.01$;c:与模型组比较, $P < 0.05$;d:与模型组比较, $P < 0.01$;↑:含量升高,↓:含量降低

3.7 代谢通路富集分析结果

代谢通路富集分析结果显示,大鼠血管性痴呆涉及的代谢通路主要有维生素B₆代谢、脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成。结果见图5(图中气泡所在横坐标和气泡大小表示该通路拓扑分析影响因子大小,气泡越大表示影响因子越大;气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析P值,颜色越深,P值越小,表示富集程度越显著)。

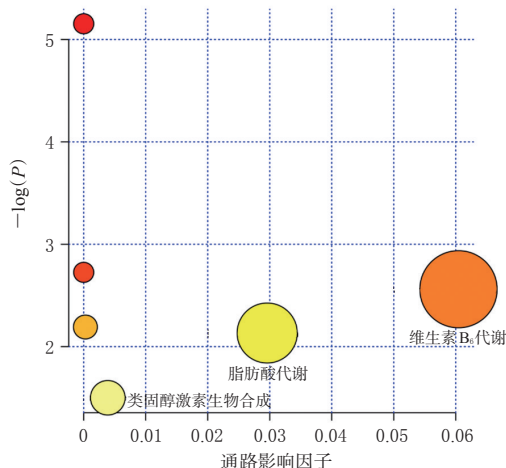


图5 大鼠血管性痴呆代谢通路富集分析结果

4 讨论

传统中医将血管性痴呆归为“痴呆”“呆病”范畴,认为气血不足、瘀阻脑窍可引起痴呆,如《伤寒论》中记载“其人喜忘者,必有蓄血。……若气机紊乱、气血相失……,喜忘,发为痴呆。”《景岳全书》中记载“痴呆症,凡平素无痰,或以郁结,或以不遂……,……而渐至痴呆。……凡心有淤血亦令健忘。”因此,传统治疗经常采用补气活血化痰的中药方剂进行治疗^[14-15]。龙生蛭胶囊是在补阳还五汤的基础上加减制成,方中12味中药分别为黄芪、水蛭、桃仁、红花、赤芍、川芎、当归、刺五加、桑寄生、石菖蒲、地龙、木香,诸药合用补气活血、逐瘀通络。本研究就其对血管性痴呆的作用及机制进行探讨。

4.1 龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠的保护作用

为阐释龙生蛭胶囊治疗痴呆的作用,本研究采用双侧结扎颈动脉制备大鼠血管性痴呆模型,并用Morris水迷宫实验探索龙生蛭胶囊对模型大鼠学习和记忆能力的影响,并选择甲磺酸双氢麦角毒碱片(商品名:喜得镇)作为阳性对照。文献研究表明,甲磺酸双氢麦角毒碱片不仅能够改善血管性痴呆模型小鼠的学习、记忆能力,临床上与其他药物联用还能改善血管性认知障碍^[16-18]。本研究通过大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数及在目标象限停留时间可以看出,甲磺酸双氢麦角毒碱片及龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠的学习、记忆能力均具有改善作用。大鼠脑组织病理结果显示,龙生蛭胶囊对血管性痴呆模型大鼠脑海马区的损伤有一定的保

护作用。血清生化指标检测结果显示,龙生蛭胶囊能够提高抗氧化酶SOD、GSH-Px水平,降低脂质过氧化产物MDA水平,说明龙生蛭胶囊可能通过抑制脂质代谢堆积引起的氧化应激损伤,对血管性痴呆模型大鼠起到保护作用。

4.2 龙生蛭胶囊改善血管性痴呆的作用通路

通过UPLC-Q-TOF/MS技术进行血清代谢组学研究,结果显示,大鼠血管性痴呆涉及的代谢通路主要有维生素B₆代谢、脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成。

4.2.1 维生素B₆代谢与痴呆的关系 李阳春等^[19]研究发现,同型半胱氨酸水平升高可促进老年化认知功能障碍,加速轻度认知障碍向痴呆转变的进程,增加老年痴呆的发生率。同型半胱氨酸水平增加与B族维生素缺乏密切相关,尤其是叶酸、维生素B₆等^[20-21]。本研究代谢通路富集分析结果显示,龙生蛭胶囊能够调控维生素B₆代谢通路,而维生素B₆缺乏会导致同型半胱氨酸水平升高,从而诱发痴呆,提示龙生蛭胶囊治疗血管性痴呆的机制可能与此通路密切相关。

4.2.2 脂肪酸代谢与痴呆的关系 不饱和脂肪酸是一种构成体内脂肪不可缺少的脂肪酸,分为单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸。单不饱和脂肪酸最常见的是油酸,多不饱和脂肪酸包括亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸等。以往研究显示,不饱和脂肪酸具有神经保护作用,而其中的反式脂肪酸摄入过多则会引起认知功能障碍的发生^[22-24];花生四烯酸与二十二碳六烯酸为神经细胞质膜的关键组成部分, α -亚麻酸为长链二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的前体物质,均与痴呆有一定的关系^[25-26]。本研究代谢通路富集分析结果显示,龙生蛭胶囊干预大鼠血管性痴呆模型中,涉及的差异代谢物有硬脂酸等,涉及的代谢通路有亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、花生四烯酸代谢等,提示龙生蛭胶囊治疗血管性痴呆的机制可能与脂肪酸代谢有关。

4.2.3 类固醇激素生物合成与痴呆的关系 类固醇激素与人类的成长和衰老密切相关。有实验表明,脱氢表雄酮和硫酸脱氢表雄酮可提高小鼠的空间认知、行为辨别及记忆能力^[27-28]。本研究代谢通路富集分析结果显示,龙生蛭胶囊治疗血管性痴呆的机制可能与类固醇激素生物合成有关,该结果与以往研究基本一致。

综上所述,龙生蛭胶囊对血管性痴呆所致小鼠学习和记忆能力下降具有一定的改善作用,其作用可能与改善血管性痴呆发生过程中脂质堆积造成的氧化应激损伤有关,涉及的代谢通路主要有维生素B₆代谢、脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成。

参考文献

- [1] 中国痴呆与认知障碍指南写作组,中国医师协会神经内科医师分会,认知障碍疾病专业委员会.2018中国痴呆与认知障碍诊治指南:一:痴呆及其分类诊断标准[J].中华医学杂志,2018,98(13):965-970.
- [2] 胡起超.血管性痴呆中医证候流行病学调查[J].光明中医,2021,36(20):3395-3398.
- [3] 陈昭,吴林,蓝雪琳,等.血管性痴呆发病机制中西医研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(1):40-44.
- [4] 江冠亚,陈少云.补肾益智汤治疗老年血管性痴呆的效果观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(2):215-216.
- [5] 郭改艳,刘胜武.血管性痴呆诊断、中医辨证及西医发病机制的研究进展[J].医学综述,2016,22(15):2978-2981.
- [6] SUN X L, GUO S Z, WANG Y, et al. Neuroprotective effect of Longshengzhi capsule following permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. J Tradit Chin Med Sci, 2020,7(1):12-19.
- [7] 孙晓丽,王勇,刘俊杰,等.龙生蛭胶囊对脑卒中大鼠行为学的影响及脑组织的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(24):23-29.
- [8] 郭宏伟,曾树林,杨金凤,等.龙生蛭胶囊联合西药治疗气虚血瘀型血管性痴呆48例临床观察[J].中医杂志,2014,55(16):1393-1397.
- [9] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:445.
- [10] 杨坤,宋小鸽,阮静茹,等.艾灸改善血管性痴呆大鼠认知功能及对海马神经元凋亡相关蛋白的影响[J].中国针灸,2021,41(12):1371-1378.
- [11] 谭子虎,陈延,刘茜,等.加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马CA1区细胞凋亡及PTEN信号通路的影响[J].中华中医药学刊,2017,35(10):2471-2474.
- [12] 罗俊,张科楠,肖帅,等.镇心省睡益智方及其精油对AD模型小鼠学习记忆的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(9):74-81.
- [13] 闫盼盼,闫国立,詹向红,等. Morris水迷宫实验设计的统计学方法探析[J].中华中医药学刊,2013,31(2):264-266.
- [14] 邓敏贞,钟晓琴,高志杰,等.人参皂苷Rb3联合 β -细辛醚对血管性痴呆模型小鼠的改善作用及其机制研究[J].中国药房,2020,31(16):1967-1973.
- [15] 朱云鹤,吴云虎,方向.通窍活血汤治疗瘀血内阻型血管性认知障碍的临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(2):139-143.
- [16] 甲磺酸双氢麦角毒碱规范治疗专家组.甲磺酸双氢麦角毒碱在神经系统疾病治疗中的应用建议[J].中华老年心脑血管病杂志,2011,13(8):697-700.
- [17] 李金艳,李响.脑心通胶囊与喜得镇联合治疗血管性认知功能障碍[J].海南医学,2008,19(12):12-13.
- [18] 梁翠萍,樊敬峰,吕佩源,等.血管性痴呆小鼠海马NMDA受体mRNA表达特征及喜得镇的影响[J].卒中与神经疾病,2005,12(4):212-214.
- [19] 李阳春,杨琴.血同型半胱氨酸与痴呆相关性研究进展[J].现代医药卫生,2019,35(10):1524-1527.
- [20] 董珍,朱婷珂,徐俊.同型半胱氨酸与痴呆:国际共识声明[J].中国卒中杂志,2019,14(2):142-148.
- [21] 杨旭,季一飞,张珊珊,等.血浆同型半胱氨酸和尿酸水平在帕金森病中的作用[J].西部医学,2018,30(2):201-204.
- [22] 宋晓雯,麻微微.膳食因素与老年人认知功能障碍相关性研究进展[J].中国公共卫生,2017,33(10):1532-1535.
- [23] 张永平.不饱和脂肪酸及神经免疫网络相关因子改善老年痴呆样病变的机制[D].湛江:广东海洋大学,2017.
- [24] 刘后芹,张玉凤,王彩凤.血压相关膳食模式与阿尔兹海默症患者认知功能程度的关系[J].护理实践与研究,2019,16(23):36-38.
- [25] 王晓良,马飞,师思,等.痴呆症与脑脂肪酸转运代谢异常的研究[J].神经药理学报,2018,8(2):64.
- [26] 于梦芸.艾灸及艾烟对APP/PS1双转基因AD小鼠的尿液、血浆靶标代谢组学研究[D].北京:北京中医药大学,2017.
- [27] 李静,白玉,张鹏,等.脱氢表雄酮对血管性痴呆小鼠学习和记忆能力的改善作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(10):1905-1909.
- [28] KAUFMAN M J, KANAYAMA G, HUDSON J I, et al. Supraphysiologic-dose anabolic-androgenic steroid use: a risk factor for dementia[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 100:180-207.

(收稿日期:2021-10-25 修回日期:2022-02-28)

(编辑:舒安琴)