

· 药物代谢 ·

塞络通胶囊治疗急性脑缺血模型大鼠的代谢组学分析

张聪¹, 刘建勋^{1*}, 孙明谦¹, 张业昊¹, 任常英¹, 尹春园^{1,2}

(1. 中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091;
2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 从代谢组学角度研究塞络通胶囊治疗急性多发性脑梗死大鼠模型的作用机制。方法: 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和塞络通组(33 mg·kg⁻¹), 通过大鼠颈内动脉注射荧光微球的方法建立急性多发性脑梗死大鼠模型。手术成功后, 塞络通组大鼠通过十二指肠注射给药, 给药体积 2 mL·kg⁻¹。基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析各组大鼠脑组织中内源性代谢物, 应用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)进行模式识别及生物标志物的鉴定。结果: 通过模式识别发现假手术组与模型组的代谢轮廓有明显差异, 并鉴定了 10 个与急性脑缺血相关的生物标志物。与假手术组相比, 模型组中 *N*-乙酰天门冬氨酸(NAA), 延胡索酸, 谷胱甘肽, 脱氢抗坏血酸, 天门冬氨酸以及 *S*-腺苷同型半胱氨酸含量下降, 精氨酸、瓜氨酸、酵母氨酸、乙内酰脲-5-丙酸含量升高; 而塞络通胶囊则可使上述 10 个异常变化的生物标志物水平显著回调。结论: 塞络通胶囊主要调节的代谢途径有 NAA 代谢、精氨酸代谢、能量代谢及氧化应激等。

[关键词] 塞络通胶囊; 急性脑缺血; 代谢组学; 生物标志物; 代谢途径; *N*-乙酰天门冬氨酸代谢; 精氨酸代谢
[中图分类号] R22; R969.1; R743; O657; R28; C37 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)14-0136-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191552
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190419.1026.002.html>
[网络出版时间] 2019-04-22 08:39

Metabonomics Analysis of Sailuotong Capsules in Treatment of Acute Cerebral Ischemia in Rats

ZHANG Cong¹, LIU Jian-xun^{1*}, SUN Ming-qian¹, ZHANG Ye-hao¹, REN Chang-ying¹, YIN Chun-yuan^{1,2}
(1. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Sailuotong capsules in treating acute cerebral ischemia from the perspective of metabonomics. Method: A total of 24 SD rats were randomly divided into 3 groups, including sham-operated group, model group and Sailuotong group (33 mg·kg⁻¹). The rat model of acute multiple cerebral infarction was established by injecting fluorescent microspheres into internal carotid artery. After the successful operation, rats in Sailuotong group were administered by duodenal injection immediately, and the dosage volume was 2 mL·kg⁻¹. Endogenous metabolites in rat brain tissues of each group were determined by UPLC-Q-TOF-MS. The relevant data and biomarkers were analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). Result: The analysis of pattern recognition indicated that the metabolite profiles in model group and sham-operated group were separated obviously, and ten biomarkers related to acute cerebral ischemia were also identified. Compared with the sham-operated group, contents of

[收稿日期] 20190110(011)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2015CB554405); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09737009); 北京市“十病十药”项目(Z171100001717004)
[第一作者] 张聪, 在读博士, 助理研究员, 从事中药代谢组学研究, Tel: 010-64089832, E-mail: zc0904@aliyun.com
[通信作者] * 刘建勋, 研究员, 博士生导师, 从事药理学及中药学研究, Tel: 010-62874049, E-mail: liujx0324@sina.com

N-acetylaspartate (NAA), fumaric acid, glutathione, dehydroascorbic acid, aspartic acid and *S*-adenosylhomocysteine were decreased, while the contents of arginine, citrulline, saccharopine and hydantoin-5-propionic acid were increased in the model group. Meanwhile, the ten abnormal biomarkers mentioned above got restoration in Sailuotong group. **Conclusion:** The main regulated metabolic pathways of Sailuotong capsules are NAA metabolism, arginine metabolism, energy metabolism, oxidative stress, etc.

[Key words] Sailuotong capsules; acute cerebral ischemia; metabonomics; biomarkers; metabolic pathways; *N*-acetylaspartate metabolism; arginine metabolism

缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 具有发病率高、死亡率高和并发症多等特点,严重危害了人类的身心健康,也给患者家庭和社会带来了沉重的负担与经济压力^[1-2]。ICVD 的发病因素众多,目前已知的病因包括高血压、高血脂、糖尿病、肥胖等^[3],但具体发病原因较为复杂,发病机制的研究和相关治疗药物的研制还不够多。特别是急性脑缺血性疾病极易反复发作,容易引起脑梗死,对老年人身体危害很大。因此,亟需深入研究急性脑缺血的发病机制,以便于寻找有效的治疗方案。

中医学认为,ICVD 以气血不足、脉络瘀阻为主要病机,治疗上当以益气活血通络为原则^[4]。塞络通胶囊(原名维脑康,SLT)是由人参、银杏叶、西红花分别提取有效组分后配伍组成,结合现代药理学研究开发的中药复方,具有益气活血、健脑益智等功效,主治血管性痴呆、缺血性中风恢复期等缺血性脑血管疾病。本课题组前期对其药效物质基础研究后发现,塞络通胶囊的人参皂苷、银杏内酯等有效成分能够快速进入体循环并进入脑组织,通过各自的药理活性发挥治疗作用^[5-6]。药理研究发现,塞络通胶囊对多发性脑梗死痴呆大鼠等动物模型显示了很好的疗效,能够有效保护脑组织,升高脑内与学习记忆相关的神经递质水平^[7-8]、改善认知功能障碍^[9-10]、延迟痴呆病程发展,对脑缺血有预防和治疗作用^[11]。实验中还发现该药物在脑缺血动物模型上较对照药银杏叶片(达纳康)和石杉碱甲片(哈伯因)表现出了更好的改善学习记忆能力、提高认知功能、改善脑缺血区的血液循环等作用,这可能与促进脑组织乙酰胆碱(Ach)活性、降低自由基损伤有关,但其作用机制仍有待进一步阐明。

近年来,随着代谢组学研究的不断发展,该技术在中医药防治 ICVD 上发挥着越来越重要的作用^[12-13]。在前期研究的基础上,本研究拟建立基于液质联用技术和多元数据分析相结合的代谢组学分析方法,从代谢组学角度对塞络通胶囊调节急性多

发性脑梗死大鼠模型的作用机制进行研究,挖掘其调节的生物标志物及相关代谢途径,为进一步探索塞络通胶囊的作用机制提供了实验依据。

1 材料

1290 型超高效液相色谱仪和 6520 型 Q-TOF 质谱仪(美国 Agilent 公司),MIKRO 22R 型高速离心机(德国 Hettich 公司),705 型低温冰箱(美国 Thermo 公司),VCX 150PB 型匀浆机(美国 Sonics 公司)。塞络通胶囊(神威药业集团有限公司,批号 150914),荧光微球(UVPMS-BY2,美国 Cospheric 公司,批号 100309-7),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20131027),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,体质量 140 ~ 160 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。大鼠于西苑医院实验动物中心适应性饲养 1 周,温度 20 ~ 23 ℃,相对湿度 40% ~ 60%,控制照明(12 h/12 h 昼夜循环)。本实验均符合北京实验动物福利伦理审查指南的相关要求。

2 方法与结果

2.1 大鼠多发性脑梗死模型的制备^[14] 各组大鼠用 3.5% 水合氯醛(剂量 0.1 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,仰卧颈部备毛,在大鼠颈部最薄软处正中切口,分离颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA),结扎 ECA 远心端,动脉夹夹闭 CCA,行颈外动脉插管,用注射器将荧光微球 0.2 mL 从 ECA 向 ICA 注入。松开动脉夹,结扎 ECA 近心端,缝合伤口,回笼饲养。术后 24 h 对大鼠进行神经功能缺损情况评分,评分为 1 ~ 3 分的大鼠表示模型制备成功;死亡,0 分及 4 分的大鼠直接淘汰。

2.2 动物分组与给药 24 只雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组,分别为假手术组、模型组、塞络通组(33 mg·kg⁻¹)。多发性脑梗死模型造模成功后,塞络通组立即通过十二指肠注射给药(剑突下方开口,开口与腹中线平行,开口尽可能小,取出十二指肠,注射给药,给药体积 2 mL·kg⁻¹)。

2.3 脑组织匀浆液的制备与处理 多发脑梗死术后 24 h, 模型大鼠以 3.5% 水合氯醛 (剂量 $0.1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉, 开颅取脑, 分离大鼠缺血侧脑组织约 100 mg, 与 10 倍量生理盐水混合, 用匀浆机以中等转速充分打碎脑组织样品, 制备匀浆液, 每次打碎混匀时间 15 s, 共进行 2 次, 中间暂停时间 10 s, 打碎过程中保持脑组织样品浸于冰浴之中。每个脑组织样品打碎搅拌后, 匀浆机搅拌转头用蒸馏水清洗并擦干。所有脑组织样品制备成匀浆液后离心 ($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 取上清液。为保证整个样品测定过程的稳定性, 在每 6 个待测样品中插入 1 个质控 (QC) 样品进行检测。分析结束后, 对 QC 样品中代表性成分的保留时间和离子强度进行比较, 以保证实验分析在允许的误差范围内。UPLC-Q-TOF-MS 测定前, 脑组织匀浆液在室温下解冻。取样品 $40\text{ }\mu\text{L}$, 加入有机溶剂 [乙腈-甲醇 (1:1)] $200\text{ }\mu\text{L}$, 混匀振摇 1 min, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 ($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清液进样分析。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$); 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的乙腈-水 (1:9) 混合液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 梯度洗脱 (0~3 min, 92% B; 3~10 min, 92%~82% B; 10~13 min, 82%~75% B; 13~15 min, 75%~72% B; 15~17 min, 72%~92% B), 17 min 时停止, 两针之间平衡时间 2 min。流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源, 雾化气和干燥气均为氮气, 碰撞气为氦气, 采集模式为正、负离子模式, 毛细管电压 3 500 eV, 雾化温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速 $600\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 雾化气压力设定 207 kPa, 扫描范围 m/z 80~1 000, 数据储存模式为 centroid。质谱采集数据通过 2 个已知的对照品 [hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine 和 7H-嘌呤, 二者对应的 m/z 分别为 922.009 8 和 121.050 9] 进行实时矫正。参比液通过 Agilent Isocratic 泵以 $0.01\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度喷入质谱。Auto MS/MS 实验采用碰撞诱导裂解 (CID) 的方式, 碰撞能量 30 eV。

2.5 数据处理与分析 通过 Agilent MassHunter 2.0 和 MPP (mass profiler professional) B2.0 软件进行数据分析。在分子特征提取 (molecular feature extraction, MFE) 分析中 m/z 的丰度数值 > 500 的数据被采集纳入 mass features 的计算中。丰度的计算

是由 MassHunter 2.0 软件对一个分子相应的 isotopic 和 adductive peaks 丰度加合后产生。最后, 在采集的 mass features 中, 丰度 > 3 000 的 features 被纳入和整理成数据以待进一步分析。通过 MassHunter 2.0 软件产生的数据, 进一步输入到 MPP B2.0 软件中进行分析。MPP B2.0 分别采用排列、归一化、数据集分割和数据缩放等方法对数据集进行预处理, 所得数据最后应用 SIMICAP⁺ 12.0 统计软件进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)。

2.6 代谢组学分析

2.6.1 大鼠脑组织的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 由于脑组织匀浆液中极性大的水溶性成分较多, 利用亲水作用色谱-串联质谱法 (HILIC-MS) 对急性多发性脑梗死大鼠模型脑组织进行代谢组学研究。HILIC-MS 较常规的反相液相色谱-串联质谱法 (RPLC-MS) 提高了样品检出效率, 实现了对更多水溶性成分的分析, 为塞络通胶囊作用机制的研究提供了基础。正、负离子模式下急性脑缺血模型大鼠脑组织样品的总离子流图见图 1。对于 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学研究, QC 样本由等量的不同样本混合制成, 在 UPLC-Q-TOF-MS 分析过程, 每进 6 个样本后进 1 个 QC 样本。从 QC 样本中选 5 个代表性的特征峰用来评价整个实验的稳定性。在整个实验中, t_{R} 的波动 < 0.2 min, δ < 10 ppm, 离子强度变化的 RSD < 20%。结果显示色谱分离和质谱检测的稳定性、重复性均符合要求。

2.6.2 模式识别分析 分别采用 PCA 和 PLS-DA 对假手术组、模型组和塞络通组脑组织匀浆液中的代谢物谱进行模式识别, 得到三者的模式识别图, 见图 2。结果发现假手术组与模型组呈现出明显的分离趋势, 说明两者的代谢物谱存在明显差异。塞络通组与模型组也呈现出较明显的区别, 并且有向假手术组恢复的趋势, 提示塞络通胶囊对急性脑缺血大鼠模型的内源性代谢物产生了显著回调的作用。

2.6.3 潜在生物标志物的发掘与鉴定 对假手术组和模型组进行数据分析, 从中挖掘与急性脑缺血相关的生物标志物。在此基础上, 对这些生物标志物在假手术组、模型组和塞络通组中的变化进行归纳, 如果在塞络通组中这些生物标志物有向假手术组回调的趋势, 说明其可能是塞络通胶囊发挥治疗作用的生物标志物, 并通过生物标志物进一步确定相关的生物代谢通路, 为阐明该制剂调节急性多发性脑梗死大鼠模型的作用机制提供依据。利用

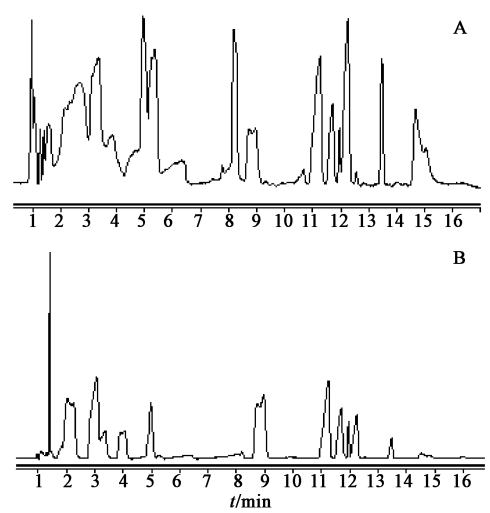


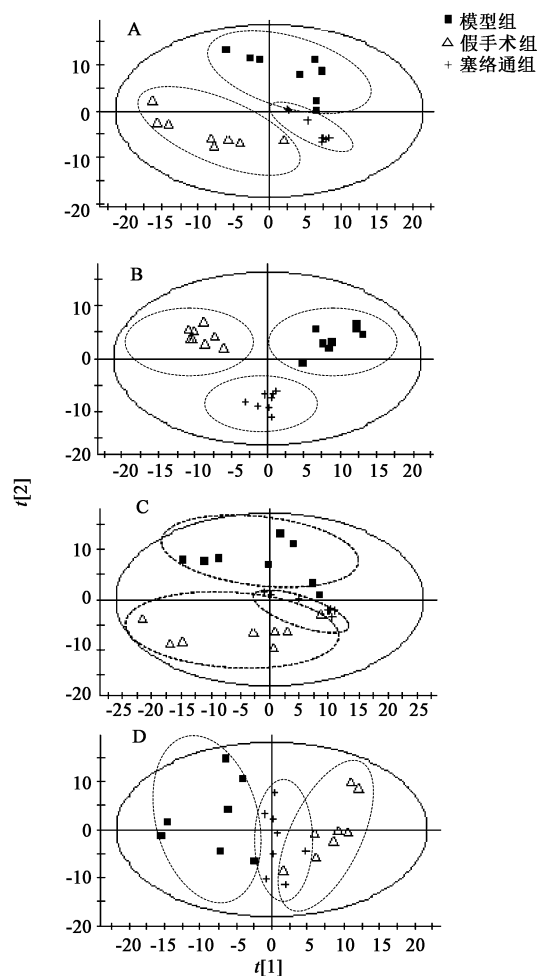
图1 正离子(A)和负离子(B)模式下急性多发性脑梗死模型大鼠脑组织样品的UPLC-Q-TOF-MS总离子流

Fig.1 Total ion current chromatograms of brain tissue samples of rats with acute multiple cerebral infarction under positive ion mode (A) and negative ion mode (B) by UPLC-Q-TOF-MS

MPP B2.0 软件对化合物进行初步鉴定,根据 PLS-DA 模型得到的变量重要性投影(VIP)值选择假手术组与模型组差异大的变量,对VIP值>1且 $P<0.05$ 的离子进行初步鉴定。进一步分析这些成分在假手术组、模型组和塞络通组中的变化,在塞络通组中呈现明显向假手术组回调的成分,即为潜在生物标志物。通过质谱分析与Metlin数据库、人类代谢组数据库(HMDB)或对照品比对,筛选鉴定出与塞络通胶囊治疗作用相关的生物标志物10个,见表1。

3 讨论

本文建立了急性多发性脑梗死大鼠模型,基于液质联用技术和多元数据分析相结合的代谢组学分析方法,对假手术组、模型组和塞络通组大鼠脑组织中的代谢物谱进行模式识别,挖掘与急性脑缺血相关以及塞络通胶囊发挥调节作用的生物标志物,分析相关的生物代谢通路。本研究发现与假手术组比较,模型组中N-乙酰天门冬氨酸、谷胱甘肽、脱氢抗坏血酸等10个生物标志物含量发生了显著变化,说明这10个生物标志物是与急性脑缺血相关的生物标志物;其中,N-乙酰天门冬氨酸(NAA),延胡索酸,谷胱甘肽,脱氢抗坏血酸,天门冬氨酸以及S-腺苷同型半胱氨酸含量下降,精氨酸、瓜氨酸、酵母氨酸、乙内酰脲-5-丙酸含量升高。与模型组相比,塞络通组中上述10个生物标志物有了显著的回调($P<0.05$),且均有向假手术组水平恢复的趋势,说



A. 正离子的 PLS-DA 得分 [R^2 (建模所用的主成分对原始数据的解释度) = 0.993, Q^2 (模型的可预测度) = 0.820]; B. 负离子的 PLS-DA 得分 ($R^2 = 0.990$, $Q^2 = 0.857$); C. 正离子的 PCA 得分; D. 负离子的 PCA 得分

图2 假手术组、模型组和塞络通组大鼠脑组织样本的模式识别

Fig. 2 Pattern recognition of brain tissue of rats from sham-operated group, model group and Sailuotong group

明这些内源性代谢产物以及相关的代谢途径在塞络通胶囊的调节下趋于正常,体内的代谢紊乱得到了调整。主要调节的代谢途径包括NAA代谢、精氨酸代谢、能量代谢及氧化应激相关途径等。

NAA是一种几乎仅存在于脑神经细胞中的乙酰化氨基酸,是反映神经元脱失、神经传导活性降低的指标,在脑组织中含量较高^[15-17]。研究发现NAA在急性脑缺血损伤早期呈进行性下降,提示神经元代谢紊乱^[18-20]。NAA含量可以反映当前脑损伤的严重程度,较低的NAA含量通常代表较差的临床结局^[21-22]。本研究比较模型组和假手术组后发现,模型组的NAA及其前体天门冬氨酸的含量都出现了下降,提示可能由于急性脑缺血发生,导致神经元

表 1 塞络通胶囊发挥治疗作用的 10 种生物标志物及其生物代谢途径

Table 1 Ten biomarkers regulated by Sailuotong capsules and their metabolic pathways

No.	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	生物标志物	相关代谢途径	含量变化趋势	
					模型组 ³⁾	塞络通组 ⁴⁾
1	175.046 6	2.15	<i>N</i> -乙酰天门冬氨酸 ²⁾	<i>N</i> -乙酰天门冬氨酸代谢	↓	↑
2	174.014 6	2.67	脱氢抗坏血酸 ²⁾	氧化应激	↓	↑
3	133.038 1	11.60	天门冬氨酸 ¹⁾	天门冬氨酸代谢	↓	↑
4	116.011 1	11.70	延胡索酸 ²⁾	三羧酸循环	↓	↑
5	172.048 2	11.70	乙内酰脲-5-丙酸 ¹⁾	组氨酸代谢	↑	↓
6	307.083 8	12.00	谷胱甘肽 ¹⁾	氧化应激	↓	↑
7	175.094 1	12.80	瓜氨酸 ²⁾	精氨酸代谢	↑	↓
8	384.122 5	13.90	<i>S</i> -腺苷同型半胱氨酸 ¹⁾	甲硫氨酸代谢	↓	↑
9	174.111 6	14.60	精氨酸 ¹⁾	精氨酸代谢	↑	↓
10	276.132 4	16.20	酵母氨酸 ¹⁾	赖氨酸降解	↑	↓

注: ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; ³⁾ 与假手术组比较, ⁴⁾ 与模型组比较。

细胞受损,影响了 NAA 在脑组织各细胞间的代谢过程。此外,急性脑缺血的发生会影响能量代谢,进而影响乙酰辅酶 A 的生成,从而导致 NAA 含量下降。比较塞络通组和模型组后发现,塞络通组使 NAA 及其前体天门冬氨酸的含量发生回调,说明塞络通胶囊可以全面调节与 NAA 相关的代谢途径,保护脑神经细胞。

延胡索酸是三羧酸循环的中间产物,在模型组中延胡索酸含量变化提示线粒体功能和能量代谢异常。NAA 含量显著变化已提示脑组织能量代谢异常,延胡索酸变化进一步证实了这一结论。线粒体也是自由基的重要来源,由于正常的氧化功能反应受阻,导致大量的氧化自由基生成,进一步造成损伤。塞络通组的延胡索酸出现了明显的回调,说明塞络通胶囊可以调整能量代谢,进而稳定线粒体功能。

与假手术组比较,模型组中谷胱甘肽(GSH)含量下降提示脑缺血模型中氧化压力升高。GSH 是调节生理活性氧(ROS)水平和细胞氧化压力的重要内源性小分子,能清除人体内的氧化自由基,是体内的抗氧化剂^[23-24]。GSH 的不足与失调会影响细胞的功能,造成细胞的死亡^[25]。脱氢抗坏血酸为抗坏血酸的前体,可以透过血脑屏障进入脑组织中,起到转运抗氧化剂进入脑组织的作用,其含量下降也提示脑组织中氧化压力升高。GSH 和脱氢抗坏血酸含量同时出现异常提示模型组大鼠脑组织的氧化压力显著升高,而塞络通胶囊可以对这些代谢途径进行调节,恢复两者的含量水平,降低脑组织中的氧化压

力,从而发挥疗效。

精氨酸、瓜氨酸等多个生物标志物均与一氧化氮(NO)的生成相关^[26]。在精氨酸代谢途径中,精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)的催化下,可以合成信号分子 NO 并生成瓜氨酸。NO 的生成有助于舒张血管,调节血液流动,逆转动脉粥样硬化,预防并使心脑血管疾病康复^[27-28]。但 NO 对神经系统的作用具有双面性,过量的 NO 会导致脑神经细胞死亡,其会过度激活 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NDMA)受体,造成神经元损伤。在脑缺血状态下 NOS 可以被诱导表达,并伴随有 ROS 包括过氧化亚硝酸盐和超氧化物的产生,这些物质会对脑组织造成氧化应激损伤,并诱导炎症反应造成脑组织的持续损伤。塞络通胶囊可以使精氨酸、瓜氨酸的含量恢复,说明其可以稳定精氨酸-瓜氨酸-NO 的代谢途径,减少脑组织的氧化应激和炎症损伤等。

本研究首次从代谢组学角度探讨了塞络通胶囊调节急性多发性脑梗死大鼠模型的作用机制,发现其通过调节 NAA 代谢、精氨酸代谢、能量代谢、氧化应激等多个代谢途径发挥作用,体现了中药复方多靶点协同作用的特点,本实验结果为塞络通胶囊作用机制的深入研究打下基础。塞络通胶囊中的主要化学成分能改善学习记忆能力,对脑缺血损伤有保护作用。结合本实验结果,推测由于急性脑缺血初期,能量代谢受阻,同时氧化应激损伤加剧,塞络通胶囊中具有益气活血和抗氧化作用的人参皂苷、西红花苷、银杏内酯和黄酮类成分等可能是其发挥作用的主要成分。在此基础上,本研究后续还将基于

非靶向代谢组学和靶向代谢组学技术对塞络通胶囊调节慢性脑缺血大鼠模型的作用机制进行系统研究。

[参考文献]

[1] YIN Y W, LI J C, LI B H, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis [J]. Int J Neurosci, 2014, 124 (4): 252-260.

[2] 张静, 赵建军, 杨伟, 等. 基于中医证候特征的缺血性中风复发风险的横断面分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (12): 194-198.

[3] WANG H P, SHI S J, YAN W J, et al. Ischemic stroke susceptibility gene in a Northern Han Chinese population [J]. Neural Regen Res, 2013, 8 (20): 1881-1891.

[4] 吴玉芙, 刘晓红, 郭伟成, 等. 补阳还五汤对气虚血瘀型脑梗死患者脑血管储备功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (12): 162-167.

[5] 张颖, 林力, 刘建勋, 等. 塞络通灌胃后人参皂苷在大鼠体内的药代动力学及脑分布研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (2): 316-321.

[6] 张颖, 林力, 刘建勋, 等. 中药复方塞络通中银杏内酯类成分的药代动力学及脑分布研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16 (7): 1458-1464.

[7] 徐立, 宋文婷, 林成仁, 等. 塞络通胶囊对大鼠多发性脑梗死恢复期 Glu 和 GABA 合成以及 NMDA 受体亚型表达的影响 [J]. 药学报, 2012, 47 (7): 870-877.

[8] 徐立, 丛伟红, 魏翠娥, 等. 维脑康对小鼠记忆障碍的影响 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23 (6): 60-62.

[9] 徐立, 林成仁, 刘建勋, 等. 塞络通胶囊对多发梗死性痴呆大鼠认知功能障碍的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (19): 2943-2946.

[10] 徐立, 刘建勋, 丛伟红, 等. 维脑康胶囊对慢性脑低灌注大鼠脑内胆碱能系统及清除自由基能力的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (5): 531-534.

[11] 任建勋, 徐立, 林成仁, 等. 塞络通胶囊在络脉瘀阻证脑梗死大鼠缺血时间窗外给药的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (12): 3060-3063.

[12] 郭慧, 崔扬, 王秋红, 等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (1): 213-219.

[13] 孟胜喜, 霍清萍, 王兵, 等. 代谢组学技术在中医药防治缺血性脑血管病研究中的应用 [J]. 中医杂志, 2016, 57 (17): 1515-1518, 1521.

[14] Takagi N, Miyake K, Taguchi T, et al. Failure in learning task and loss of cortical cholinergic fibers in microsphere-embolized rats [J]. Exp Brain Res, 1997, 114 (2): 279-287.

[15] Koller K J, Coyle J T. Ontogenesis of *N*-acetyl-aspartate

and *N*-acetyl-aspartyl-glutamate in rat brain [J]. Brain Res, 1984, 317 (1): 137-140.

[16] 蔺俊斌, 廖维靖. *N*-乙酰天冬氨酸与缺血性卒中的研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志, 2011, 8 (9): 501-504.

[17] 刘雪辉, 曹平, 钟文, 等. 天智颗粒联合盐酸多奈哌齐片对轻中度肝阳上亢证血管性痴呆的临床分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (7): 177-181.

[18] Muñoz Maniega S, Cvorov V, Chappell F M, et al. Changes in NAA and lactate following ischemic stroke: a serial MR spectroscopic imaging study [J]. Neurology, 2008, 71 (24): 1993-1999.

[19] Demougeot C, Marie C, Giroud M, et al. *N*-acetylaspargate: a literature review of animal research on brain ischaemia [J]. J Neurochem, 2004, 90 (4): 776-783.

[20] LEI H, Berthet C, Hirt L, et al. Evolution of the neurochemical profile after transient focal cerebral ischemia in the mouse brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29 (4): 811-819.

[21] Lemesle M, Walker P, Guy F, et al. Multi-variate analysis predicts clinical outcome 30 days after middle cerebral artery infarction [J]. Acta Neurol Scand, 2000, 102 (1): 11-17.

[22] van Zandvoort M J, van der Grond J, Kappelle L J, et al. Cognitive deficits and changes in neurometabolites after a lacunar infarct [J]. J Neurol, 2005, 252 (2): 183-190.

[23] Morris D, Khurasany M, Nguyen T, et al. Glutathione and infection [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830 (5): 3329-3349.

[24] Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, YU Y M, et al. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (10): 5071-5076.

[25] 易文龙. 谷胱甘肽对新生大鼠脑缺血缺氧脑细胞内钙和脂质过氧化影响的研究 [J]. 数理医药学杂志, 2004, 17 (4): 371-372.

[26] 郭志丽, 朱妍, 肖红斌, 等. 与脑梗死关联的氨基酸代谢通路研究进展与发现 [J]. 中国医药导报, 2013, 10 (26): 24-27.

[27] 陈瑞群, 廖成彬, 郭茜, 等. 结合血清代谢组学与支持向量回归机揭示右归丸调节肾虚证的代谢标志物群及其作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (13): 62-70.

[28] Rector T S, Bank A J, Mullen K A, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure [J]. Circulation, 1996, 93 (12): 2135-2141.

[责任编辑 刘德文]