

# 偏头痛大鼠的血浆代谢组学研究

李慧<sup>1</sup>, 吴艳华<sup>1</sup>, 江善明<sup>1</sup>, 陈宝田<sup>2</sup>, 刘莉<sup>2</sup>, 刘强<sup>2</sup>

1. 广州市红十字会医院中医科, 广东 广州 510220;

2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

**摘要:** **目的** 运用代谢组学方法,研究大鼠偏头痛的发病机制。**方法** 采用改进的 Christina tassorelli 方法建立大鼠偏头痛模型(模型组)并设正常对照组。取大鼠血样,通过超高效液相色谱仪结合高分辨率质谱仪联用(UPLC-Q-TOF/MS)对模型组与正常对照组血浆进行代谢谱检测。通过 Micromass Markerlynx 软件对采样数据进行归一化处理。统计学分析使用 SIMCA-P + 软件偏最小二乘法进行模式识别。**结果** UPLC-Q-TOF 代谢色谱图显示,与正常对照组相比,模型组的 UPLC 图出峰量明显增多,而且两组图谱之间有一定程度的关联性。散点分布图显示,正常对照组和模型组血标本均具有明显的聚类作用,且有趋势显著的分类运动。模型组与正常对照组的荷载图并结合 MS-MS 的串联质谱结果显示,5-羟吲哚乙酸、3,4-二羟苯乙二醇、磷脂酰胆碱为潜在的生物标志物。**结论** 本研究建立了基于大鼠血样的 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学研究方法,初步阐释了偏头痛发病的生物标志物及代谢组学机制。

**关键词:** 偏头痛; 代谢组学; 超高效液相色谱; 高分辨率质谱; 5-羟吲哚乙酸; 3,4-二羟苯乙二醇; 磷脂酰胆碱; 大鼠

中图分类号: R 747.2 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2016)12-1716-04

## Plasma metabonomic analysis of migraine in rats

LI Hui\*, WU Yan-hua, JIANG Shan-ming, CHEN Bao-tian, LIU Li, LIU Qiang

\* Department of traditional Chinese medicine, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou, Guangdong 510220, China

**Abstract: Objective** To investigate the pathogenesis of rat migraine using the metabonomic method. **Methods** The migraine model of Wistar rat was established with the improved Christina tassorelli method (model group), and normal control group was set up. Taking rat blood samples, the plasma metabolic profiling in two groups was detected by the ultraperformance liquid chromatograph (UPLC) combined with high resolution mass spectrometer (Q-TOF /MS) (UPLC-Q-TOF /MS). The sample data were normalized by the Micromass Markerlynx software, and then the pattern recognition of data was made by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) of SIMCA-P + software. **Results** UPLC-Q-TOF metabolic chromatogram showed that the peak number of UPLC chromatogram in model group increased significantly compared with normal control group, and there was a relation of certain degree between the chromatograms of two groups. Scatter diagram showed that the blood samples in both two groups had significant clustering effect and a trend of significant classification movement. The results of analysis of loading plot combined with tandem mass spectrometry (MS-MS) showed that 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenyl glycol and phosphatidyl choline were the potential biomarkers. **Conclusion** This study established a UPLC-Q-TOF/MS metabonomic research method based on the rat blood samples and preliminary interpreted the biomarkers and the metabonomic mechanism of migraine pathogenesis.

**Key words:** Migraine; Metabonomics; Ultraperformance liquid chromatography; High resolution mass spectrometry; 5-hydroxyindoleacetic acid; 3, 4-dihydroxyphenyl glycol; Phosphatidyl choline; Rat

偏头痛是一种周期性发作的头痛,具有反复发作迁延难愈的特点。作为一种可造成失能的原发性头

痛疾病,会给患者造成极大的痛苦,WHO 将偏头痛与高位截瘫、精神分裂症和痴呆并列为最严重的慢性功能障碍性疾病<sup>[1]</sup>。迄今对本病的发病机制尚未形成统一的认识,已有的研究常集中于单个的体液因子和基因<sup>[2]</sup>。本研究采用代谢组学的方法,通过观察偏头痛动物模型中血样小分子代谢产物含量的变化,探讨偏头痛的可能发病机制。

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2016.12.040

基金项目: 国家自然科学基金(81202687); 广东省科技计划项目(2012B061700018); 广东省中医药管理局科研课题(20141218)

## 1 材料与方法

1.1 仪器 UPLC 色谱仪和 Q-TOF/MS 质谱仪(美国 WATERS 公司);Aquity UPLC-C18 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);低温高速离心机(德国 Beckman 公司);超声清洗仪(江苏昆山和创仪器有限公司);超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂 硝酸甘油注射液(广州明兴制药厂,批号:20121121)。甲酸(色谱级, TEDIA 公司);甲醇和乙腈(色谱级, Merck 公司);亮氨酸, 脑啡肽(Sigma 公司)。

1.3 实验动物 20 只 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各 10 只,体重 180 ~ 220 g,购于南方医科大学实验动物中心。

1.4 动物模型的建立 参照改动的 Christina tassorelli 方法<sup>[3]</sup>,按照 10 mg/kg 硝酸甘油皮下注射在模型组大鼠的左侧额部及颞部,正常组大鼠皮下注射相同剂量生理盐水。以行为学观察(大鼠出现双耳泛红,四肢频繁搔头,爬笼次数增多,烦躁不安)验证造模成功。

1.5 样本采集与预处理 造模 6 h 后,采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠,腹主动脉采血,采血量约为 8 ml, EDTA 抗凝, 3 000 r/min 离心共 10 min 分离血浆,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过上清液,备用。

1.6 分析条件<sup>[4]</sup>

1.6.1 色谱条件 色谱柱: Aquity UPLC-C18 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);流速设定为 0.5 ml/min;柱温设定为 45 °C;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液;设置梯度洗脱程序为 5% B ~ 5% B, 2 min; 5% B ~ 60% B, 6 min; 60% B ~ 100% B, 2 min; 100% B ~ 100% B, 2 min; 100% B ~ 5% B, 2 min; 5% B ~ 5% B, 2 min。

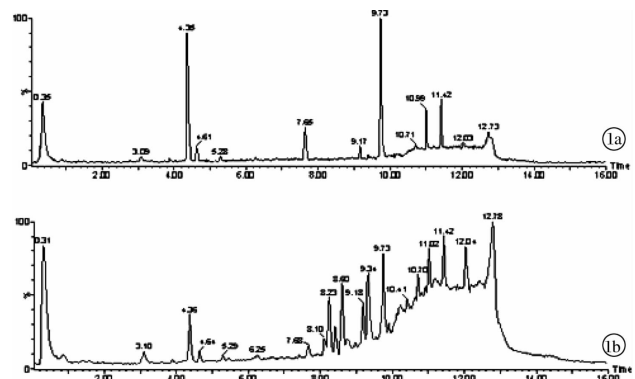
1.6.2 质谱条件 电喷雾离子源,采用正离子模式检测;脱溶剂气流量为 600 L/h,脱溶剂气温度设定为 350 °C,雾化气流量设定为 100 L/h,离子源温度设定为 120 °C,毛细管电压设定为 3 200 V,锥孔电压设定为 30 V,微通道板电压设定为 2 300 V,碰撞能设定为 3 V。采图频率为每 0.14 秒 1 次;以亮氨酸-脑啡肽溶液进行准确质量测定校正。质量扫描范围为 100 ~ 900 m/z。

1.7 数据处理 原始数据的归一化处理采用 Micromass Markerlynx 软件进行,后续数据采用 SIMCA-P+ 统计学软件进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)。

## 2 结果

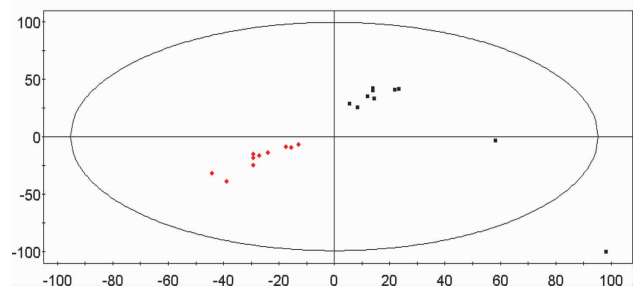
2.1 两组间代谢物图谱差异 两组大鼠血浆 UPLC-Q-TOF 代表色谱图见图 1。图 1 显示,与正常组相比,模型组的代谢 UPLC 图出峰量明显增多,而且两组图谱之间有一定程度的关联性。

2.2 两组大鼠潜在生物标志物 采用 SIMCA-P+ 软件对 Markerlynx 处理后数据进行 PLS-DA 分析,根据结果得到散点分布图(Scores plot, 图 2)及荷载图(Loadings plot, 图 3)。由图 2 可知,正常组和模型组血浆标本均具有明显的聚类作用,且有趋势显著的分类运动。分析模型组与正常组的荷载图并结合的串联质谱(MS-MS)结果可知,5-羟吲哚乙酸、3,4-二羟苯乙二醇、磷脂酰胆碱为潜在的生物标志物。



注:1a:正常组;1b:模型组。

图 1 两组大鼠血浆 Q-TOF 色谱图



注:左为正常组,右为模型组。

图 2 模型组与正常组对比的散点分布图

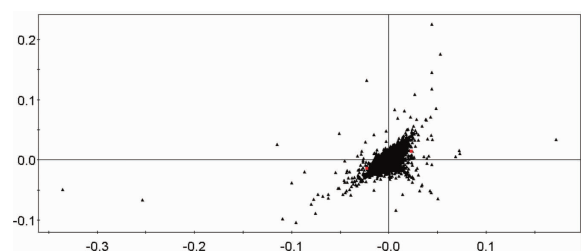


图 3 模型组与正常组对比的荷载图

## 3 讨论

作为一种新兴的组学方法,代谢组学实验过程中

影响因素很多。比如,样本的采集和进样前的预处理方法会直接影响结果的稳定性。动物本身血浆中的代谢产物复杂、性质差异性大、浓度波动范围广,方法不稳定、操作不规范、参数设置偏差等因素均会影响代谢图谱的分析。

血浆进样前处理的过程主要是蛋白沉淀的过程。血浆中存在各种蛋白质、酶类和酯类等大分子物质,它们对样品中代谢物分析结果的影响较大。血浆蛋白沉淀方法较多,溶剂及其比例的正确选择可以最大程度去除样品中混淆结果的蛋白,又可以避免对小分子代谢物检测的影响,对各组标本的后续数据的检测和整体实验的可重复性具有重要意义。现在实验室中比较常用的蛋白沉淀有机溶剂包括乙腈、甲醇、乙醇、丙酮等,其中乙腈最为常用。在进行沉淀蛋白时,有机溶剂含量浓度越高,蛋白沉淀的效果越好,但随着有机溶剂浓度的不断增加,样本稀释过多,目标小分子浓度降低,容易出现漏检;浓缩样品的过程又存在代谢物损失、污染等风险。因此,合适的有机溶剂比例是正确提取小分子代谢物的前提<sup>[5]</sup>。本课题组前期预实验结果表明,血浆/乙腈比例为 1:2 即可获得良好的提取效果。

5-羟吲哚乙酸是 5-羟色胺(5-HT)通过单胺氧化酶(MAO)作用的代谢产物。5-HT 又名血清素,广泛分布在心血管组织、局部神经系统、血细胞和中枢神经系统,参与机体多系统的生理代谢,是人体内一种重要的神经递质和自身调节物质<sup>[6]</sup>。血浆中的 5-HT 除对血管舒缩具有影响外,还参与人体的睡眠、精神调节、内源物质分泌及体温变化<sup>[7-11]</sup>。此外,它还是脑与脊髓内存在的一种痛觉调节递质<sup>[12]</sup>。在偏头痛发作的整个过程中,存在不同程度的 5-HT 代谢紊乱。在偏头痛发作先兆期,血浆中 5-HT 含量增加,发挥收缩血管的作用,同时 5-HT 增加去甲肾上腺素的血管收缩作用,从而导致并加剧偏头痛先兆期血管痉挛收缩的现象。偏头痛发作期,5-HT 迅速代谢变为 5-羟吲哚乙酸,并且快速经过肾脏排泄,从而导致血液中 5-HT 急剧减少。5-HT 含量的快速降低会反射性的引起头部血管反跳性扩张,从而导致发作期的血管扩张性头痛发作<sup>[13]</sup>。由于外周循环中的 5-HT 多分布于小肠的肠肌丛,故偏头痛患者发作时常伴有消化道症状<sup>[14-15]</sup>。

本研究发现模型组的 3,4-二羟苯乙二醇较正常组升高,可能与造模过程中大量去甲肾上腺素代谢为 3,4-二羟苯乙二醇有关。去甲肾上腺素具有减弱外周疼痛信号的作用,并能提高痛觉阈值<sup>[16]</sup>。此外,去甲肾上腺素可通过降低肽神经递质的释放从而增强

其抑制疼痛的效果<sup>[17]</sup>。如果去甲肾上腺素介导的抑痛系统出现问题,就会导致痛阈降低和慢性痛觉敏感<sup>[18]</sup>。资料表明,偏头痛发作时血浆中多巴胺含量明显降低,去甲肾上腺素含量减少,在头痛好转的几个小时内可以逐渐恢复到正常<sup>[19]</sup>。

磷脂酰胆碱又称卵磷脂,是“三大营养素”之一,也是磷脂混合物中最重要的组成部分。磷脂酰胆碱主要分布在神经系统、肝、肾上腺及红细胞中,是组织细胞膜的重要组成部分,具有保护自由基攻击生物大分子导致的膜损伤的作用;同时也是细胞间传导信号的前体物质<sup>[20]</sup>。磷脂酰胆碱是合成乙酰胆碱(Ach)的前体,而 Ach 参与神经细胞的众多信息传递<sup>[21]</sup>。增加脑内 Ach 含量能充分提高大脑神经突触的可塑性,改善大脑神经细胞的活性,从而提高学习记忆能力,并有效预防老年痴呆症的发生<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠血浆磷脂酰胆碱下降,提示神经细胞信息传递紊乱,学习记忆能力下降,这一结果与偏头痛患者多数存在不同程度的学习记忆能力下降现象相符合。

#### 参考文献

- [1] Cavestro C, Mandrino S. Thrombophilic disorders in migraine[J]. *Front Neurol*, 2014, 5: 120.
- [2] Benemei S, De Cesaris F, Fusi C, et al. TRPA1 and other TRP channels in migraine[J]. *J Headache Pain*, 2013, 14: 71.
- [3] Chang CL, Donaghy M, Poulter N. Migraine and stroke in young women: case-control study. The World Health Organisation Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception[J]. *BMJ*, 1999, 318(7175): 13-18.
- [4] 李慧, 吴艳华, 陈宝田, 等. 正天丸对偏头痛大鼠尿液 5-HIAA 和 PEA 的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39(5): 450-452.
- [5] Lai L, Michopoulos F, Gika H, et al. Methodological considerations in the development of HPLC-MS methods for the analysis of rodent plasma for metabolomic studies[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(1): 108.
- [6] 庞志强, 王振华, 相宜, 等. 炎症介质 5-羟色胺与疼痛发生机理的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(12): 2077-2080.
- [7] 王智, 徐瑞鑫, 李丽娟, 等. 慢性束缚应激对大鼠行为学和杏仁核 5-HT、5-HIAA 含量的影响及加味甘麦大枣汤的干预[J]. *中医学报*, 2014, 42(4): 79-82.
- [8] 郑莉明, 史亚飞, 吴皓萌, 等. 中枢 5-HT 能系统在早发性抑郁中的作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(1): 19-23.
- [9] 林圃, 傅继华. 外周 5-HT 与相关疾病的研究进展[J]. *中外健康文摘*, 2013(49): 57-58.
- [10] 杨晨玉, 韩亚楠, 王子旭, 等. 5-HT 转运体/受体在肠道疾病发生中的作用研究进展[J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(6): 720-724.
- [11] 苏晖, 施慎逊. 5-HT<sub>1A</sub> 受体对抑郁焦虑行为的调节作用及其机制[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(9): 1403-1406.
- [12] Watts SW. Serotonin and sensory nerves: Meeting in the cardiovascu-

- lar system[J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 63(1):1-3.
- [13] Vollbracht S, Rapoport AM. The pipeline in headache therapy[J]. *CNS Drugs*, 2013, 27(9):717-729.
- [14] 付焱, 杨双革, 王云志, 等. 偏头痛机制及抗偏头痛倍半萜天然产物的研究进展[J]. *河北医科大学学报*, 2008, 29(1):153-157.
- [15] 景富春, 张军. 5-羟色胺代谢动力学与功能性胃肠病的研究靶点[J]. *胃肠病学*, 2014, 19(10):625-627.
- [16] 杨阳, 樊碧发. 神经病理性疼痛药物治疗回顾与展望[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(14):1628-1630.
- [17] 赵晓芸, 蒋永亮, 吴媛媛, 等. 电针干预健康大鼠疼痛抑郁行为的海马 NE 机制[J]. *浙江中医杂志*, 2014, 49(8):562-564.
- [18] Watson CP, Gilron I, Sawynok J, et al. Nontricyclic antidepressant analgesics and pain; are serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) any better? [J]. *Pain*, 2011, 152(10):2206-2210.
- [19] Suzuki T, Yamauchi T, Ando K, et al. Phase I study of clofarabine in adult patients with acute myeloid leukemia in Japan[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2013, 43(12):1177-1183.
- [20] Chen S, Subbiah PV. Regioisomers of phosphatidylcholine containing DHA and their potential to deliver DHA to the brain: role of phospholipase specificities[J]. *Lipids*, 2013, 48(7):675-686.
- [21] 刘志刚, 韩波, 李培杰. 免疫活性细胞非神经乙酰胆碱系统的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(11):1221-1223.
- [22] Mohamd EM, Ahmed HH, Estefan SF, et al. Windows into estradiol effects in Alzheimer's disease therapy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(10):1131-1140.

收稿日期:2016-08-10 修回日期:2016-09-20 编辑:王国品

· 社区医学 ·

## 针对社区高血压病危险因素进行健康宣教的探讨

王晶<sup>1</sup>, 刘笑菲<sup>2</sup>, 杜微<sup>2</sup>, 刘福旭<sup>2</sup>

1. 吉林大学第四医院预防保健科, 吉林 长春 130011;
2. 吉林大学第四医院急诊医学科, 吉林 长春 130011

**摘要:** **目的** 了解一汽集团离退休人员中高血压病患病情况及相关危险因素,探讨如何针对其危险因素开展健康宣教。**方法** 在一汽厂区 25 个工作站随机选取参加健康体检的离退休人员 734 名,统计高血压病患病情况及控制情况,对比高血压组与无高血压组腰围、体质指数(BMI)、空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯、尿酸、同型半胱氨酸、尿微量蛋白、尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶等危险因素的差别,为一汽厂区离退休人员的高血压病健康管理工作提供依据。**结果** 共检出高血压患者 347 名,患病率为 47.2%;262 名已知患高血压病者,规律管理高血压病者仅为 22.9%。高血压组 BMI、腰围、同型半胱氨酸、血糖、尿酸、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平、尿微量蛋白水平均高于无高血压组( $P$  均  $< 0.05$ ),Logistic 回归分析结果发现腰围对于高血压病影响更为明显( $OR = 1.483$ ),腰围是引起高血压病的重要危险因素。**结论** 目前社区高血压病规律管理率低,高血压病患病率与 BMI、腰围、尿微量蛋白、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、空腹血糖、尿酸、同型半胱氨酸的水平关系密切。需针对高血压的危险因素进行宣教,提倡良好生活方式。

**关键词:** 高血压病; 危险因素; 健康宣教; 社区

**中图分类号:** R 544.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)12-1719-03

高血压病是常见的心脑血管疾病之一,近年来随着其发病率不断上升,已成为威胁人类生命及健康的主要疾病之一。随着我国人口年龄结构的变化及健康保健意识的增强,高血压病越来越受到重视,近年来高血压病的危险因素成为了国内外学者研究的重点。本研究对一汽集团厂区离退休人员中高血压病患病情况及相关危险因素进行分析,并以此为依据制定科学有效的高血压病健康宣教方案。

### 1 资料与方法

1.1 对象 一汽厂区 25 个工作站随机选取年龄在 51~82 岁参加健康体检的离退休人员 734 名。

1.2 诊断标准及变量意义 根据 1999 年 WHO/ISH 及《中国高血压防治指南(试行本)》,高血压诊断标准:以收缩压(SBP)  $\geq 140$  mm Hg 和(或)舒张压(DBP)  $\geq 90$  mm Hg 或正在服用抗高血压药物者,即可诊断为高血压病<sup>[1]</sup>。体质指数(BMI) = 体重/身高<sup>2</sup>,以我国成人判定标准,BMI  $\geq 24$  为超重或肥胖,男性腰围  $\geq 85$  cm、女性腰围  $\geq 80$  cm 为中心性肥