

• 基础研究 •

胆酸和去氧胆酸抗惊厥作用的血清代谢组学研究

周俊发¹, 乔婷婷¹, 张志宏², 叶仕高¹, 陈洁欣¹, 匡海学², 王秋红^{1,2*}¹广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; ²黑龙江中医药大学省部共建教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江中医药大学天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

[摘要] 目的: 探究胆汁酸单体化合物胆酸(cholic acid, CA)和去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)的抗惊厥作用机制。方法: 将3周龄雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、丙戊酸钠组(sodium valproate/valproic acid, VPA, 189 mg/kg)、CA组(60 mg/kg)和DCA组(60 mg/kg), 每组9只, 对照组及模型组为假给药, 各给药组于造模前1 h预给药, 连续给药16 d。采用(45.0±0.5)℃水浴建立惊厥大鼠模型, 每隔1 d水浴1次, 共计8次, 观察记录模型组及各给药组大鼠惊厥发作时间、惊厥结束时间, 对大鼠惊厥发作行为的严重程度进行评分。检测大鼠血清及海马组织中白介素1β(interleukin 1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)和IL-6含量及海马组织中谷氨酸(glutamic acid, Glu)和γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)含量, 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察海马神经元病理损伤。超高效液相色谱仪串联高分辨质谱技术对大鼠血清进行代谢组学分析。结果: 与模型组相比, 各给药组大鼠惊厥潜伏期均显著延长, 惊厥持续时间显著缩短($P < 0.001$); VPA组和DCA组惊厥发作等级显著降低($P < 0.001$, $P < 0.01$), CA组差异无统计学意义。与对照组相比, 模型组血清和海马组织中TNF-α, IL-6和IL-1β含量均显著升高($P < 0.001$), 海马组织中Glu和GABA含量均显著升高($P < 0.001$); 与模型组相比, DCA组和VPA组各项生化指标水平均显著降低($P < 0.001$), 而与模型组相比, 除血清中IL-1β和海马组织IL-6的水平外, CA组其他各项指标均显著降低($P < 0.01$)。海马组织HE染色结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠海马组织中锥体细胞胞体紧缩, 体积变小, 染色加深, 嗜碱性增强, 胞质胞核分界不清; 与模型组相比, 各给药组大鼠海马神经元细胞形态得到明显改善。其中, DCA组大鼠海马神经元细胞形态与VPA组相近。血清代谢组学分析结果经过数据处理、文献及数据库比对, 共鉴定出312个差异化合物。通过主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘法判别分析, 共筛选出9个差异化合物; 代谢通路富集结果显示, CA和DCA的抗惊厥作用主要涉及柠檬酸循环、氨基酸代谢和丁酸代谢通路。结论: CA和DCA对热性惊厥大鼠的行为学和生化指标等均具有一定的改善作用, 其作用机制可能与惊厥过程中的能量代谢、氨基酸代谢和丁酸等短链脂肪酸代谢有关。

[关键词] 胆酸; 去氧胆酸; 惊厥; 代谢组学; 代谢通路**[中图分类号]** R971.6**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2024)05-604-11**doi:** 10.7655/NYDXBNSN231037

Serum metabolomics study of the anticonvulsant effects of cholic acid and deoxycholic acid

ZHOU Junfa¹, QIAO Tingting¹, ZHANG Zhihong², YE Shigao¹, CHEN Jiexin¹, KUANG Haixue², WANG QiuHong^{1,2*}¹School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; ²Key Laboratory of Basic and Applied Research on Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Material Basis and Pharmacological Effect, Harbin 150040, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the anticonvulsant mechanisms of bile acid monomer compounds cholic acid (CA) and deoxycholic acid (DCA). **Methods:** Male SD rats were randomly divided into a control group, a model group, a sodium valproate or valproic acid (VPA), (189 mg/kg), a CA group (60 mg/kg), and a DCA group (60 mg/kg), with nine rats in each group. The rats in the control group and model group were given placebo, and the mice in each treatment group was pre-treated 1 h before modeling, and continuously treated for 16 d. A seizure rat model was established using a water bath at (45.0±0.5)°C, with a bath given every other day for a total of eight times. The seizure onset time, seizure termination time, and the severity of seizure behavior of rats were observed and

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707100); 国家自然科学基金(8177141630); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09731-001)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qhwang668@sina.com

recorded. Meanwhile, the levels of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF- α) in rat serum and hippocampal tissues, as well as the contents of glutamate (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) in hippocampal tissues were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological damage of hippocampal neurons. Metabolomic analysis of rat serum was performed using the ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Results:** Compared with the model group, all treatment groups significantly prolonged the latency of seizures but significantly reduced the duration of seizures ($P < 0.001$); both the VPA group and DCA group significantly reduced the severity of seizures ($P < 0.001$, $P < 0.01$), while there was no significant difference in the CA group. Compared with the control group, the contents of IL-1 β TNF- α , and IL-6 in serum and hippocampal tissues of the model group were significantly increased ($P < 0.001$), and the contents of Glu and GABA in hippocampus were also significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the effects produced by the DCA group and the VPA group were similar, both of which reduced the levels of various biochemical indicators ($P < 0.001$), while the CA group significantly reduced all indicators except the TNF- α level in serum and the IL-6 level in the hippocampus ($P < 0.01$). HE staining results of hippocampal tissues showed that compared with the control group, the pyramidal cells in the hippocampus of rats in the model group were contracted, with a smaller volume, a darker staining, an enhanced alkalinity, and the unclear cytoplasmic nuclear boundaries; compared with the model group, the morphology of hippocampal neurons in each treatment group was significantly improved. Among them, the morphology of hippocampal neurons in the DCA group was similar to that in the VPA group. A total of 312 differential compounds were identified in serum metabolomics analysis. Through principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) analysis, nine differential compounds were selected. The results of metabolic pathway enrichment showed that the anticonvulsant effects of CA and DCA were mainly involved the citric acid cycle, amino acid metabolism, and butyric acid metabolism pathways. **Conclusion:** CA and DCA have certain improvement effects on behavioral and biochemical indicators of rats with febrile seizures, and their mechanisms of action may be correlated with energy metabolism, amino acid metabolism, and short-chain fatty acid metabolism during seizures.

[Key words] cholic acid; deoxycholic acid; seizure; metabolomics; metabolic pathways

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(05): 604-614]

热性惊厥(febrile seizure, FS)多发于儿童,是一种体温突然升高并伴随癫痫发作的神经性疾病^[1],复发风险较高。研究表明,第1次惊厥发作时年龄不满12个月的婴幼儿,在随后1年内有高达50%的概率再次出现惊厥发作^[2],而反复持续发作的惊厥会损伤海马功能,影响记忆和学习,甚至会增加成年后癫痫发作和其他神经性疾病发作的风险^[3]。目前FS的病理生理学机制尚不确切,现代研究观点多认为该疾病与遗传、神经炎症和免疫等因素有关。

地西洋、苯巴比妥、丙戊酸钠(sodium valproate/valproic acid, VPA)等药物常用于临床的抗惊厥治疗^[4],但对于婴幼儿来说,该类药物的潜在不良反应,如短暂性共济失调、呼吸抑制、心动过缓以及低血压等导致的危害甚至远超疾病本身,因此并不适合婴幼儿惊厥的预防和长期使用^[5]。中医重视整体观念,讲究辨证治疗,在疾病防治和新药开发中具有独特优势,其中动物胆汁和动物胆汁类药物应用于惊厥治疗在我国拥有久远历史。动物胆汁包括猪胆粉、牛胆粉、蛇胆粉和熊胆粉等,胆汁类药物如胆南星、化风丹、牛黄等^[6-7],它们均被证明具有镇静、抗炎、抗惊厥等多种治疗作用,但其中何种活性物

质发挥镇静抗惊厥作用暂不明确。动物胆汁相关的药物中多以胆汁酸类成分为主,胆酸(cholic acid, CA)和去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)含量丰富,是其主要的胆汁酸类成分,同时两者也是机体产生的内源性次级胆汁酸代谢成分,因此推测CA和DCA可能是动物胆汁类传统药物发挥抗惊厥作用的活性物质之一,而CA和DCA在结构上仅7 α 位相差一个羟基,因此探究两者在惊厥治疗方面可能存在的活性及差异性是有必要的。目前对于胆酸类化合物抗惊厥作用的研究甚少,其抗惊厥药效不清楚,作用机制不明。因此本研究通过胆汁酸单体化合物CA和DCA预给药惊厥大鼠,探索CA和DCA对反复性热水浴刺激导致的惊厥大鼠的药理作用,并利用血清代谢组学方法探究CA和DCA的抗惊厥作用机制,旨在为开发新的抗惊厥药物提供研究思路和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

ME104/02型电子分析天平(梅特勒-托利多仪

器上海有限公司);JY92-IIN型高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);冻干机(东京理化器械株式会社,日本);SCIENTZ-48L型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技有限公司);Epoch 2型酶标仪(BioTek公司,美国);倒置光学显微镜(奥林巴斯公司,日本);超高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher公司,美国);静电场轨道阱高分辨质谱仪(Thermo Fisher公司,美国);Waters ACQUITY UPLC C18柱 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm(Waters公司,美国);台式高速冷冻离心机 H1750R(湖南湘仪公司)。

1.1.2 试剂

羧甲基纤维素钠购自麦克林公司(J1204A);VPA购自上海源叶生物科技有限公司(S60377);CA和DCA购自美仑生物公司(O1025A, J0102A),肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素6(interleukin 6, IL-6)、IL-1β检测试剂盒均购自睿信生物科技有限公司(RX302058R、RX302856R、RX302869R);大鼠谷氨酸(glutamate, Glu)和γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)检测试剂盒购自江苏酶免生物科技有限公司(MM-0601R1、MM-0441R1)。

1.1.3 动物

3周龄的雄性SD大鼠,体重约(50±5)g,购自广东省医学实验动物中心,经检验合格后饲养于SPF级实验室,室温22~24℃,湿度60%,12h明暗交替,自由饮食饮水。本研究获得广东药科大学动物保护伦理委员会的批准(动物伦理编号:D202402-8)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立

SD大鼠经过适应性喂养后随机分为对照组、模型组、VPA组(189 mg/kg)、CA组(60 mg/kg)、DCA组(60 mg/kg),各给药组均以0.5%羧甲基纤维素钠为溶剂,每组9只。VPA、CA和DCA剂量参照国内外研究^[8-11]。

除对照组外,各组大鼠均置于装有(45.0±0.5)℃热水的容器中进行造模,水位以大鼠在水中站立刚好露出头部为宜。根据不同分组分别进行造模和给药,每2d热水浴1次,在连续8次热水浴后,根据各组惊厥表现、各项指标及文献报道情况,综合考察造模情况,造模方法参照文献[12-13]。大鼠在造模5 min后或惊厥发作后立即离水,由两位观察人员记录大鼠惊厥行为学情况,并根据拉辛量表^[14](表1)对大鼠惊厥发作行为的严重程度进行评分。每次造模前1h灌胃给药,次日不造模亦正常给药,

对照组及模型组为假给药,给予等剂量的溶剂,于末次造模3h后取材。

表1 惊厥发作评级标准(拉辛量表)

Table 1 Convulsive seizure rating criteria(Racine scale)

Seizure grade	Behavioral manifestations
0	no convulsive seizures
1	rhythmic mouth or facial twitching, and disorienting seizures
2	indirect nodding or tail wagging
3	single-limb jerky, and clonic seizures
4	multiple limb twitching or tonus, torsion and somersaulting
5	generalized ankylosis or death

1.2.2 大鼠惊厥行为学观察

每次造模时均由两位观察人员负责记录各组大鼠的惊厥发作时间、惊厥结束时间、惊厥发作等级,并计算惊厥持续时间。当大鼠出现不自主仰头动作或肢体抽动时便视为惊厥发作,大鼠从进入水中开始到惊厥发作的时间即为惊厥潜伏期。大鼠最后一次身体抽搐停止的时间即为惊厥结束时间。从大鼠惊厥发作到惊厥结束的时长便为惊厥持续时间。

1.2.3 大鼠血清及海马组织中TNF-α、IL-6和IL-1β含量检测

将大鼠麻醉后,腹主动脉取血。室温下静置1h,4℃,3 000 r/min离心15 min,吸取上清按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

将大鼠处死后,在冰上快速分离出海马组织,按照1:9的重量体积比,将海马组织称重后加入对应体积预冷的生理盐水,加入磁珠,在组织匀浆机中3 000 r/min匀浆20 s,3次。最后在高速离心机中4℃12 000 r/min离心30 min,吸取上清按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

1.2.4 大鼠海马组织中Glu和GABA含量检测

于-80℃冰箱取出分装的海马组织,按照1:9的重量体积比,加入对应体积预冷的生理盐水,以3 000 r/min 20 s,进行3次组织匀浆,4℃12 000 r/min离心30 min后,吸取海马组织上清液按照Glu和GABA试剂盒说明书进行测定。

1.2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察海马神经元病理损伤

大鼠处死后,断头取脑组织,放入4%多聚甲醛中固定24 h,梯度酒精脱水,浸蜡,石蜡包埋后切成厚4 μm的薄片,HE染色,脱水,使用中性树脂封片,

在光学显微镜下观察海马组织CA1和CA3神经元病理形态变化。

1.2.6 血清代谢组学分析

1.2.6.1 样品前处理

取出冻存的大鼠血清 60 μ L, 加入 600 μ L 质谱级纯甲醇涡旋混匀, 4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 10 min。取上清液在 50 $^{\circ}$ C 1 700 r/min, 真空度为 10 的条件下离心浓缩。待溶剂挥干后, 加入 100 μ L 的 50% 甲醇复溶涡旋混匀, 随后 4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 10 min。各样品管中取 60 μ L 上清液于质谱进样瓶中, 用于上样检测。再在各样品中分别吸取 20 μ L 上清液于 4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 10 min, 取 100 μ L 上清液用作质量控制(quality control, QC)。取 100 μ L 的 50% 甲醇于进样瓶中, 作为空白溶剂。

1.2.6.2 超高效液相色谱仪串联高分辨质谱检测条件

将各样品随机排序上机检测, 每 10 个样品中插入 1 个 QC 样品用于质控分析。

色谱条件: 柱温 40 $^{\circ}$ C, 样品盘温度 10 $^{\circ}$ C, 进样体积: 2 μ L, 流速: 0.4 mL/min, 流动相 A 相: 0.1% 甲酸水溶液, B 相: 乙腈, 梯度洗脱(0~6.0 min: 95%A \rightarrow 30%A; 6.0~11.0 min: 30%A \rightarrow 0%A; 11.0~14.0 min: 0%A; 14.0~14.1 min: 0 \rightarrow 95%A; 14.1~17.0 min: 95%A)。

质谱条件: 使用赛默飞旗下三合一 Orbitrap Fusion 进行质谱检测, 负离子模式, 离子传输管温度为 300 $^{\circ}$ C; 电压为 2 800 V; 蒸发温度为 320 $^{\circ}$ C; 鞘气 20 Arb; 反吹气 8 Arb; 检测分辨率为 30 000; 质荷比范围为 120~1200 m/z。

1.2.6.3 数据处理分析

借助 Orbitrap Fusion Tune 3.0 进行数据采集, 使用 X calibur 4.1 调取总离子流图。使用 Compound Discoverer 3.3 进行峰和保留时间的识别、提取、校正以及归一化处理。借助 Mass Frontier 8.0 推测峰二

级碎裂结构, 使用 MetaboAnalyst 进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。借助 HMDB 代谢数据库将化合物名称转换为 HMDB ID 后, 在 MetaboAnalyst 网站通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库进行通路富集和通路分析。

1.3 统计学方法

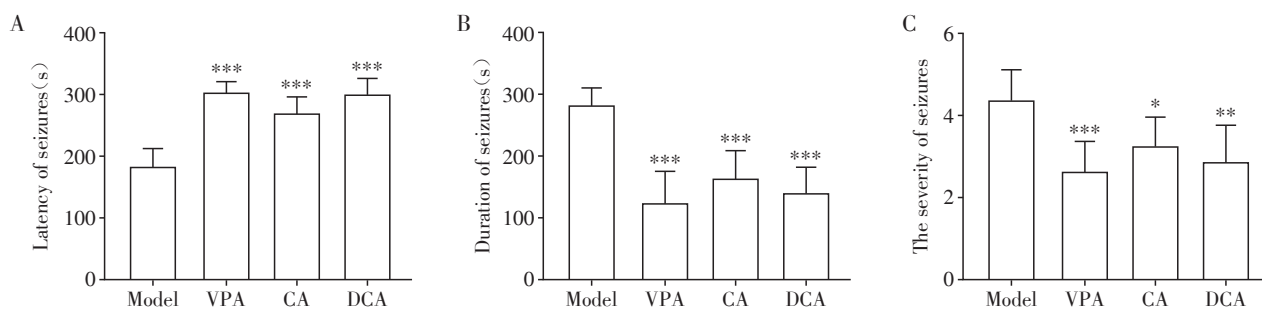
采用 GraphPad Prism 8.00 软件对实验数据进行统计分析, 实验结果采用单因素方差分析比较不同组间差异, 对于两组以上的比较, 则采用 Tukey's 分析进行事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠惊厥行为学观察

模型惊厥表现: 当热水浴开始时, 大鼠表现为四处探索, 因水温不适而出现跳跃等动作。大约 2 min 后, 因体力消耗, 大鼠挣扎频率变慢, 跳跃幅度变小。随后出现失神发作, 间歇性仰头, 在水中静止, 偶尔下沉。惊厥发生时大鼠先是出现肢体轻微抽动, 而后多肢抽动甚至全身抽搐, 多次发作。有时身体因剧烈抽搐而呈现反弓状, 甚至从桌面弹起, 全身强直。停止抽搐后大鼠处于失神状态, 四肢无力。约 3~5 min 后恢复意识, 表现为抬头, 主动探索, 舔毛, 恢复自主爬行。

与模型组惊厥表现相比, VPA 和 CA 以及 DCA 组均显著延长大鼠的惊厥潜伏期、缩短惊厥持续时间, 表现出良好的治疗作用(P 均 < 0.001 , 图 1A、B)。与模型组相比, VPA 组和 DCA 组大鼠惊厥发作的严重程度显著降低($P < 0.001$ 和 $P < 0.01$), CA 也能降低惊厥大鼠发作的严重程度, 但能力稍弱($P < 0.05$, 图 1C)。



Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=9$).

图1 各组大鼠的惊厥潜伏期(A)、惊厥持续时间(B)和惊厥发作等级(C)的比较

Figure 1 Comparisons of the convulsive latency (A), convulsive duration (B), and convulsive seizure grade (C) of rats in each group

2.2 大鼠血清及海马组织中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量分析

图2所示,与对照组相比,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平显著升高(P 均 < 0.001)。经药物干预后,各组血清炎症因子均有不同程度的降低。DCA的作用效果与VPA较为相近,而CA组的IL-1 β 表达与模型组比无显著性差异($P > 0.05$)。

如图3所示,与对照组相比,模型组大鼠海马组织中的TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平显著升高(P 均 < 0.001)。而与模型组相比,各给药组大鼠的炎症因子水平均有不同程度的降低。VPA组和DCA组大鼠TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平显著降低,两组效果相近。CA显著降低海马组织中TNF- α 和IL-1 β 含量($P < 0.001$),而CA组的IL-6水平与模型组比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

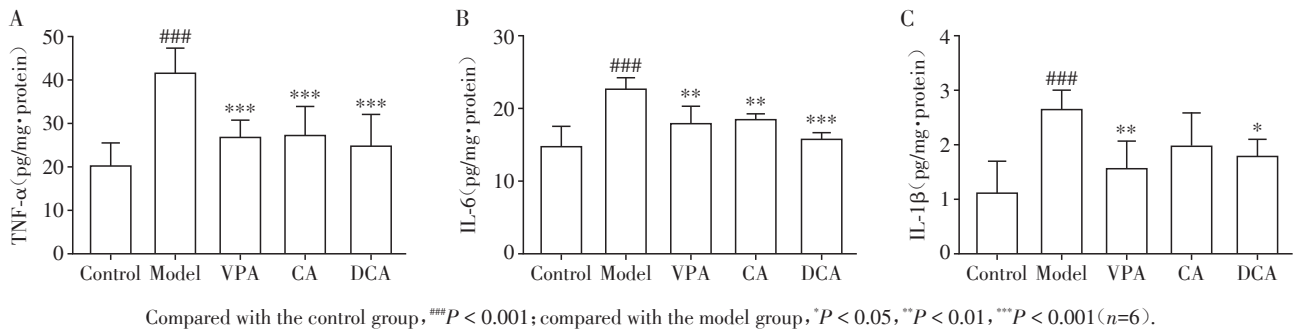


图2 各组大鼠血清中TNF- α (A)、IL-6(B)和IL-1 β (C)的含量比较

Figure 2 Comparisons of the serum content of TNF- α (A), IL-6(B) and IL-1 β (C) of rats in each group

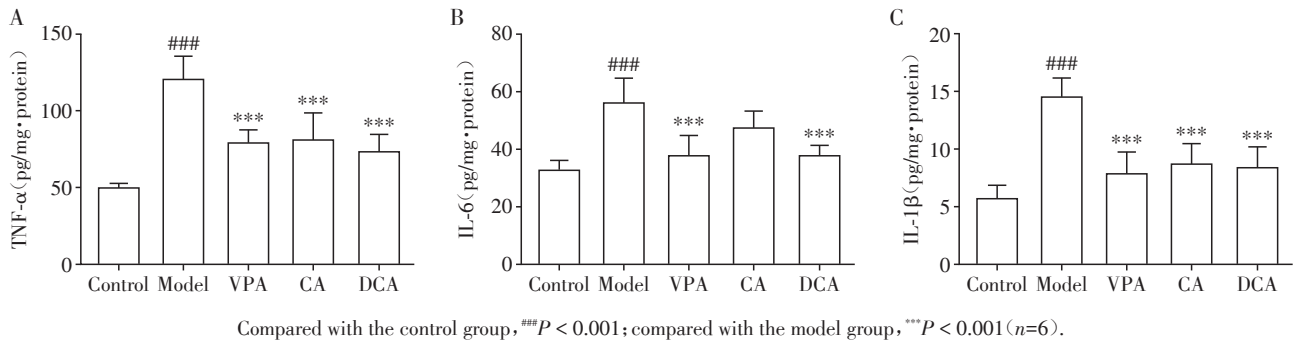


图3 各组大鼠海马组织中TNF- α (A)、IL-6(B)和IL-1 β (C)的含量比较

Figure 3 Comparisons of the hippocampus content of TNF- α (A), IL-6(B) and IL-1 β (C) of rats in each group

2.3 大鼠海马组织中Glu和GABA含量分析

如图4所示,与对照组相比,模型组大鼠海马组织中神经递质Glu的含量显著升高($P < 0.001$),GABA含量显著降低($P < 0.001$),表明惊厥对大鼠海马组

织造成损伤,而各给药组惊厥大鼠海马组织中Glu含量均显著降低(P 均 < 0.001),惊厥大鼠的GABA含量显著回升(P 均 < 0.001),表明各组给药后,惊厥导致的海马组织功能损伤得到一定恢复。

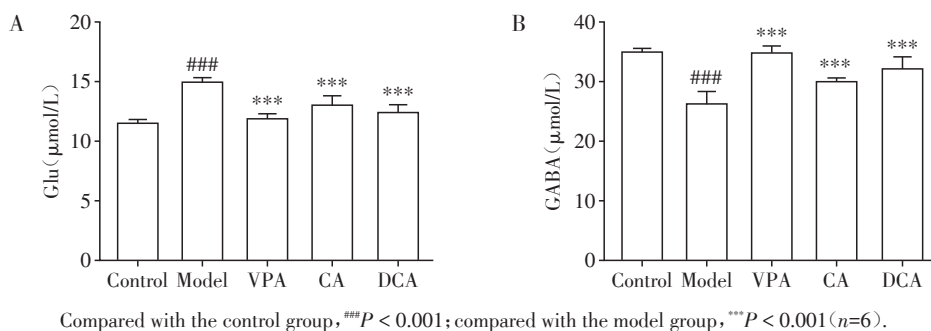


图4 各组大鼠海马组织中Glu(A)和GABA(B)含量比较

Figure 4 Comparisons of the hippocampus content of Glu(A) and GABA(B) of rats in each group

2.4 HE染色观察

如图5所示, 对照组大鼠海马区的锥体细胞(红色箭头)形态规则, 排列整齐密集, 胞核大而圆, 呈均匀淡蓝色, 核仁清楚, 细胞质丰富, 层次及细胞界限清晰。而模型组大鼠海马组织中锥体细胞胞体紧缩, 体积变小, 染色加深, 嗜碱性增强, 胞质胞核分界不清(黑色箭头)。与模型组相比, 各给药组大

鼠海马神经元细胞形态得到明显改善。虽偶有细胞空泡变性, 核固缩, 但可观察到锥体细胞数目明显增多, 排列相对整齐, 细胞形态基本正常。DCA组大鼠海马神经元细胞形态与VPA组相近。

2.5 血清代谢组学分析

使用Orbitrap Fusion Tune 3.0进行各样本质谱数据的采集后, 再通过Xcalibur 4.1调取出各样组

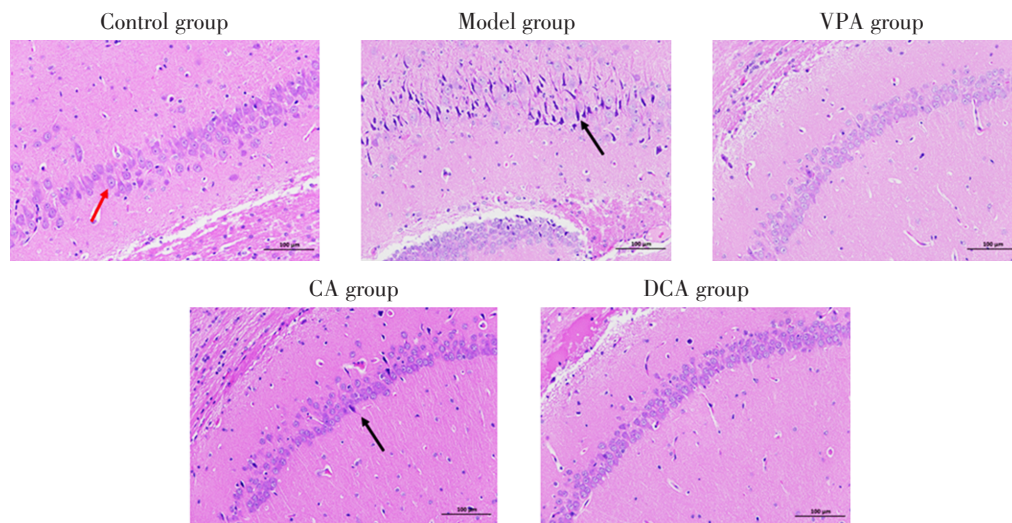


图5 海马组织HE染色切片($\times 200, n=6$)

Figure 5 HE stained sections of the hippocampal tissue($\times 200, n=6$)

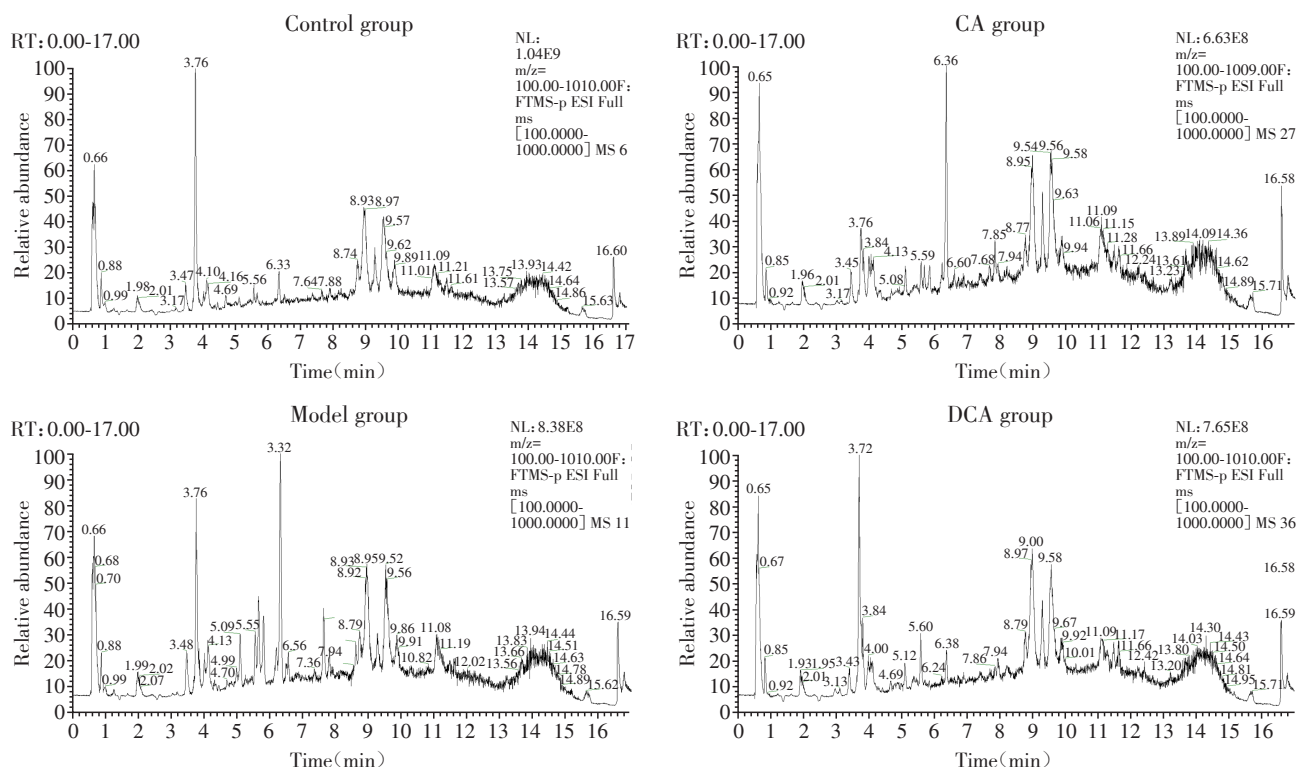


图6 各组血清的总离子流图

Figure 6 Total ion flow diagram of the serum in each group

品的总离子流图,图6为对照组、模型组、CA组和DCA组血清样品的总离子流图。随后将数据导入Compound Discoverer 3.3软件进行数据处理,经过峰提取、过滤、降噪和归一化校正数值基线等处理后,共获得1 081个色谱峰。通过与文献、ChemSpider、mzcloud和mzvault等数据库和相关标准品化合物的碎裂谱图进行比对后,共鉴定出312个化合物。化合物种类主要包括氨基酸、多肽和类似物;脂肪酸和偶联物,胆汁酸类、芳醇酸及其衍生物类;以及有机磺酸类、酮酸类、吡啶、苯及其衍生物类。

2.5.1 PCA和OPLS-DA分析

对照组、模型组与各给药组及QC之间的PCA图显示,QC分布集中,表明仪器稳定性良好,检测系统可靠。对照组和模型组数据分布较为离散,提示长期惊厥对大鼠的代谢造成了一定的影响。模型组与各给药组之间数据较为离散,表明惊厥大鼠在给药后,血清代谢发生明显改变(图7)。

OPLS-DA分析显示,对照组与模型组,模型组与CA组、DCA组分布无交叉,分离效果好,对照组与模型组:R2X=0.489,R2Y=0.911,Q2=0.840,模型组与CA组:R2X=0.340,R2Y=0.785,Q2=0.638;模型

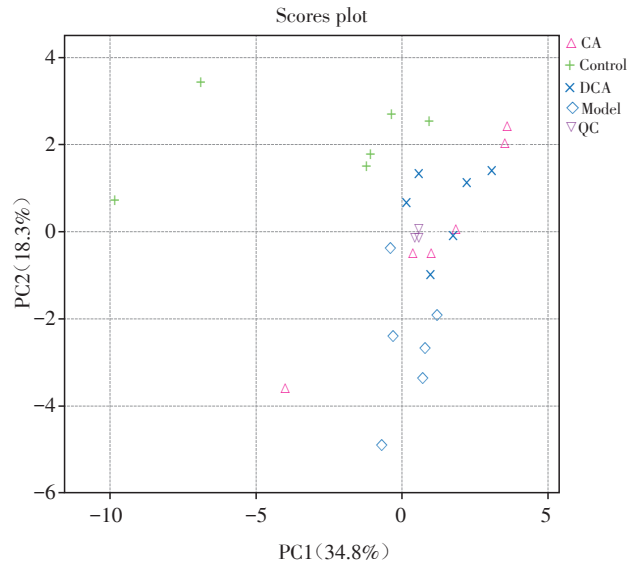


图7 各组质量控制样本的主成分分析图(n=6)

Figure 7 Principal component analysis of quality control samples in each group(n=6)

组与DCA组:R2X=0.365,R2Y=0.903,Q2=0.839。各组Q2均>0.5,表明模型稳定性良好,具有较好的预测能力(图8)。

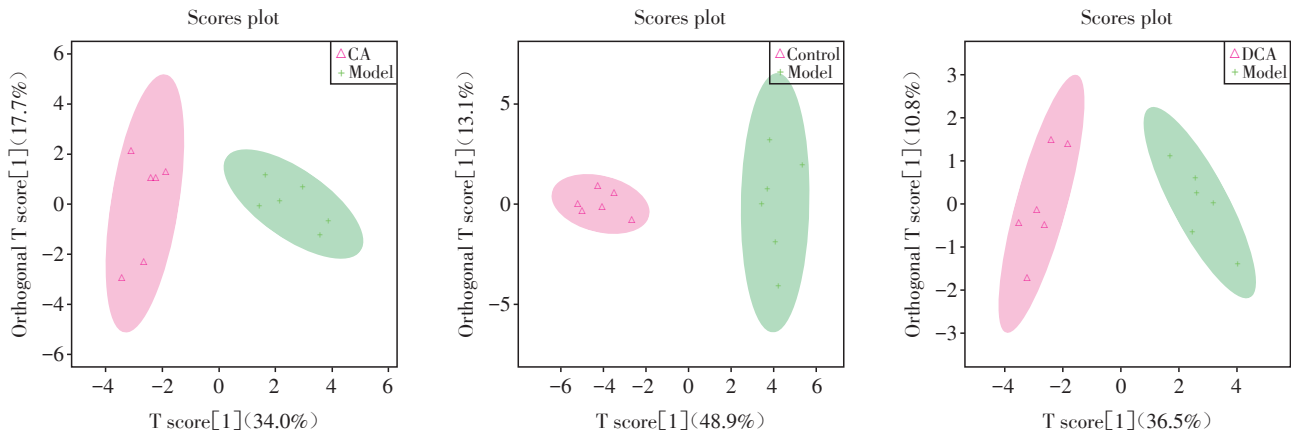


图8 各组大鼠血清OPLS-DA分析图(n=6)

Figure 8 Serum OPLS-DA analysis of rats in each group(n=6)

2.5.2 差异代谢物筛选结果

对照组与模型组血清差异代谢物分析比较共获得35个差异表达的化合物,其中模型组中有30个化合物含量升高,5个化合物含量降低(图9)。经给药后,共有13个化合物受到显著调节,其中CA组显著下调模型组中升高的11个化合物,DCA组显著下调模型组中升高的10个化合物,上调模型组中降低的1个化合物,两者共有差异代谢物9个。差异代谢物

在各组的相对含量见表2。

2.5.3 KEGG代谢通路富集分析

将模型组与各给药组的差异代谢物数据导入MetaboAnalyst分析平台中进行代谢通路富集分析。如图10所示,CA和DCA的抗惊厥作用与调节柠檬酸循环、氨基酸代谢和丁酸代谢通路有关。氨基酸代谢主要包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,精氨酸生物合成,D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢。

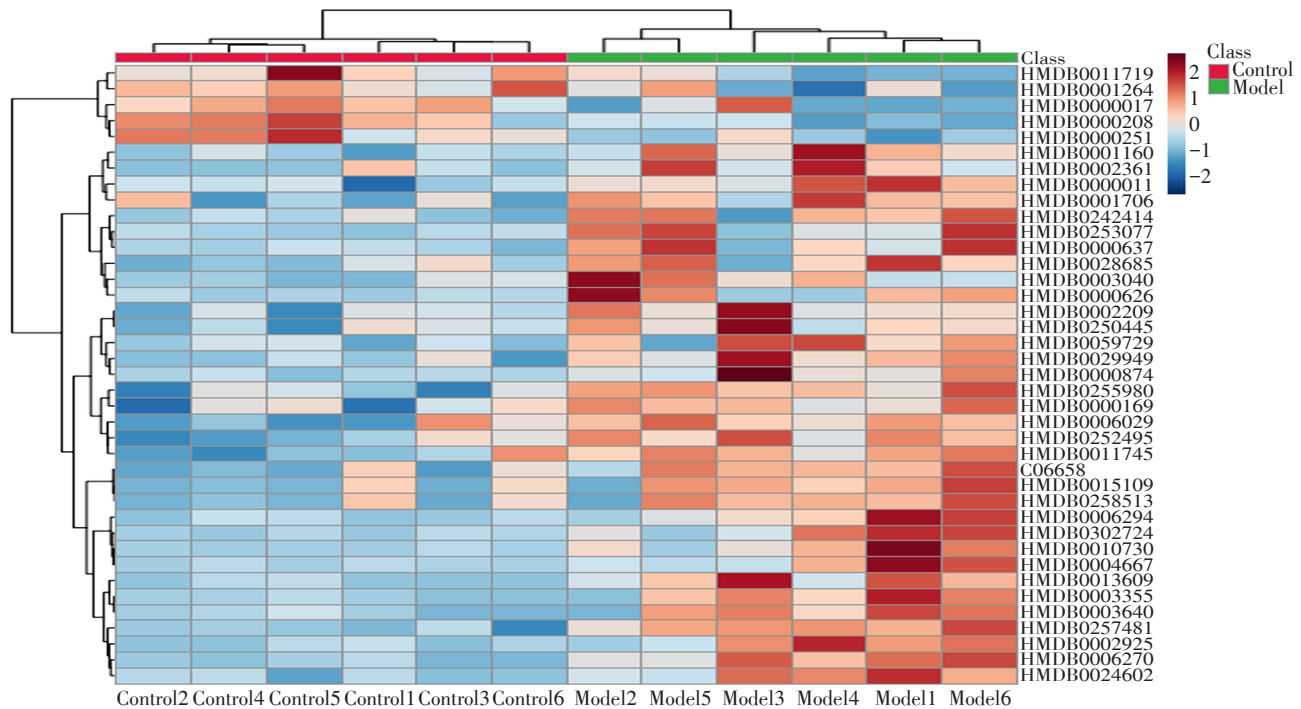


图9 对照组和模型组差异代谢物热图(n=6)

Figure 9 Heat map of differential metabolites between the control group and the model group (n=6)

表2 差异化合物在各组中的相对含量

Table 2 Relative contents of differential compounds in each group

($\bar{x} \pm s$)

Compound	Control group	Model group	CA group	DCA group
Sapacitabine	1.00 ± 0.09	2.85 ± 0.17 ^{###}	1.34 ± 0.30 [*]	1.08 ± 0.24 ^{**}
Linoelaidic acid	1.00 ± 0.03	1.88 ± 0.10 ^{###}	1.14 ± 0.05 ^{**}	1.78 ± 0.22
Pangamic acid	1.00 ± 0.21	2.17 ± 0.23 ^{###}	0.80 ± 0.11 ^{###}	1.06 ± 0.20 ^{###}
2-Oxoglutaric acid	1.00 ± 0.05	0.52 ± 0.052 ^{###}	0.73 ± 0.03	0.79 ± 0.06 [*]
DL-Tryptophan	1.00 ± 0.53	7.32 ± 1.80 ^{##}	2.32 ± 0.53 ^{**}	3.35 ± 1.08 [*]
Taurine	1.00 ± 0.09	0.53 ± 0.03 ^{##}	0.79 ± 0.08	0.66 ± 0.04
5-Aminovaleric acid	1.00 ± 0.15	5.18 ± 0.97 ^{###}	1.93 ± 0.34 ^{###}	1.68 ± 0.40 ^{###}
DL-β-Leucine	1.00 ± 0.16	3.45 ± 0.48 ^{###}	1.80 ± 0.26 ^{**}	1.34 ± 0.27 ^{###}
Acetyl-L-methionine	1.00 ± 0.10	2.06 ± 0.12 ^{###}	0.76 ± 0.18 ^{###}	0.69 ± 0.10 ^{###}
Tricosylic acid	1.00 ± 0.15	2.09 ± 0.38 [#]	1.87 ± 0.09	1.12 ± 0.10 [*]
N-Acetyl-L-glutamine	1.00 ± 0.19	2.09 ± 0.12 ^{###}	2.28 ± 0.28	2.13 ± 0.10
Arabinosylhypoxanthine	1.00 ± 0.19	3.15 ± 0.59 [#]	2.44 ± 0.87	1.57 ± 0.48
D-(+)-Mannose	1.00 ± 0.25	1.78 ± 0.15 ^{##}	1.10 ± 0.05 [*]	1.26 ± 0.05
Homovanillic acid sulfate	1.00 ± 0.09	0.39 ± 0.06 ^{###}	0.47 ± 0.05	0.35 ± 0.02
L-Alanyl-L-glutamine	1.00 ± 0.31	2.42 ± 0.34 ^{##}	1.36 ± 0.12	1.79 ± 0.28
Ethylenediaminetetraacetic acid	1.00 ± 0.48	3.16 ± 0.33 ^{##}	5.22 ± 1.33	5.06 ± 0.64
Pentacosanoic acid	1.00 ± 0.07	1.98 ± 0.31 [#]	1.19 ± 0.15 [*]	1.05 ± 0.09 [*]
4-Pyridoxic acid	1.00 ± 0.07	0.42 ± 0.07 [#]	0.85 ± 0.13	0.70 ± 0.15
Dehydroascorbic acid	1.00 ± 0.05	0.67 ± 0.08 [#]	0.71 ± 0.06	0.66 ± 0.06
Oxetacaine	1.00 ± 0.11	1.68 ± 0.13 ^{##}	1.04 ± 0.07 ^{**}	0.99 ± 0.10 ^{###}
Fructoselysine	1.00 ± 0.22	2.19 ± 0.20 ^{##}	1.17 ± 0.27 ^{**}	1.26 ± 0.24 [*]
Proclavaminc acid	1.00 ± 0.46	2.63 ± 0.22 ^{##}	4.30 ± 0.92	4.21 ± 0.51
Streptozotocin	1.00 ± 0.57	4.31 ± 0.39 ^{###}	6.33 ± 1.21	6.34 ± 0.69
Convicine	1.00 ± 0.09	1.48 ± 0.15 [#]	1.42 ± 0.19	2.04 ± 0.09

Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ (n=6).

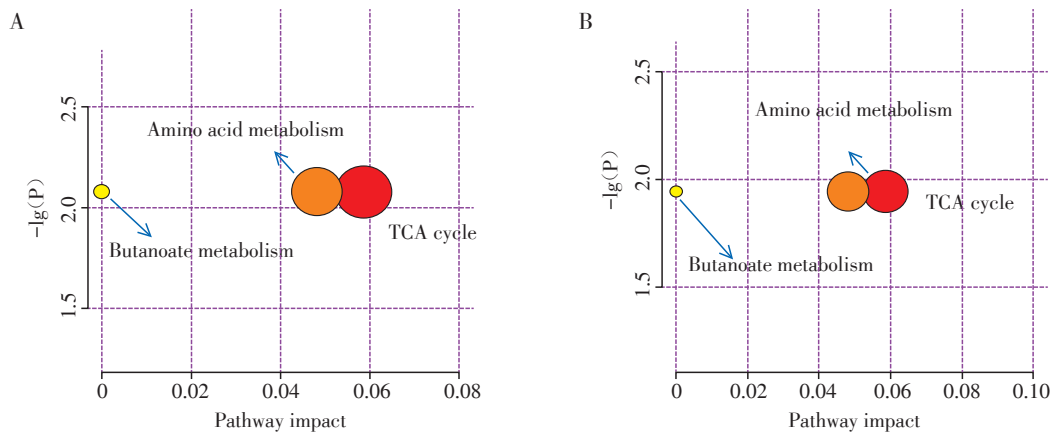


图10 模型组与CA组(A)、DCA组(B)的差异代谢物通路分析($n=6$)

Figure 10 Pathway analysis of differential metabolites between the model group and the CA group (A) and the DCA group (B) ($n=6$)

3 讨论

热性惊厥是由体温突然升高而导致的癫痫抽搐,现代病理研究表明,惊厥与炎性递质的释放和脑内神经递质的稳定性密切相关。VPA作为抗惊厥癫痫药物广泛应用,对于惊厥和癫痫等神经系统疾病具有明显的抑制作用,能抑制脑内GABA的降解,增加其合成,进而控制脑部的异常放电,从而缓解惊厥癫痫的发作,但其使用剂量需严格控制,常规的治疗剂量即可能导致诸多不良反应^[15],如胃肠道刺激、神经功能紊乱和肝损伤等。

本研究结合大鼠惊厥行为学、血清和海马组织生化指标以及HE染色切片等表明,CA和DCA均有不同程度的抗惊厥作用,能显著降低血清和海马组织中炎症递质的释放,保护炎症释放导致的海马神经元损伤,调节脑内的Glu和GABA的平衡,进而抑制脑内异常放电,缓解惊厥的损伤及发作。并且DCA的抗惊厥作用更好,效果甚至同VPA趋于一致。CA和DCA作为人体的内源性胆汁酸成分,在体内由肝脏合成并代谢,正常人每天通过肝肠循环维持体内的胆汁酸平衡,多余胆汁酸则会通过粪便排泄出体外^[16]。也有研究报道胆汁酸类成分在体内的作用时间持久,与蛋白之间的结合率高,且高浓度时导致的不良反应发生率较低^[17],因此与VPA相比,胆酸类药物在安全性方面具有更大的优势。

作为生物合成和分解代谢途径的终产物和副产物,代谢物分子一直在参与机体的生理和病理过程。通过对代谢物进行分析,可推测机体各器官和组织正在发生的生理变化^[18]。由于代谢组学固有的敏感性,可以检测到生物途径的微妙变化,有助

于深入了解各种生理病理过程背后的机制^[19]。通过代谢组学分析发现,模型组惊厥大鼠血清中牛磺酸、 α -酮戊二酸、脱氢抗坏血酸等35个化合物的含量与对照组大鼠存在显著差异,通路分析发现,异常的牛磺酸代谢、氨基酸代谢和能量代谢似乎是惊厥病理状态下的特殊的生化特征。而CA和DCA能显著调节惊厥大鼠异常的能量代谢、氨基酸代谢和丁酸代谢。

葡萄糖能通过糖酵解、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和氧化磷酸化等过程产生三磷酸腺苷为机体供能。大脑虽仅占体重的2%,但它对葡萄糖的利用却占到人体葡萄糖总利用率的25%^[20],通过对多种精神疾病的发病机制研究后发现,这些患者表现为葡萄糖的代谢利用率低,其能量代谢功能障碍,表明了能量代谢功能障碍与多种精神疾病发病可能存在的关联性^[20]。研究发现精神分裂症和双相情感障碍患者葡萄糖代谢减少,TCA循环酶活性降低,氧化磷酸化受损^[21-22]。同样地,本研究通过对差异代谢物进行通路富集分析发现,模型组大鼠的柠檬酸循环、苹果酸-天冬氨酸穿梭、糖异生作用、葡萄糖-丙氨酸循环等产能代谢水平下调,由此推测惊厥发生可能与机体的能量代谢功能障碍有关。在CA和DCA的干预下,各组大鼠的能量代谢水平显著恢复,提示胆酸和去氧胆酸的抗惊厥作用与调节机体的能量代谢有关。

氨基酸是维持机体代谢和生长发育所必需的有机化合物,还可作为细胞信号分子调节基因表达^[23],研究发现氨基酸代谢障碍似乎与多种精神疾病的发病有关^[20]。在神经系统中,内源性兴奋性氨基酸如Glu和丝氨酸作为神经递质履行突触可塑性

作用^[24]。天冬氨酸是已知的谷氨酸脱羧酶抑制剂, 它的还原可以促进抑制性神经递质 GABA 的合成。此外, 在精神疾病患者中常观察到丙氨酸、精氨酸、色氨酸、脯氨酸等氨基酸血清和血浆浓度的改变^[25]。本研究也观察到模型组大鼠血清中多种氨基酸代谢出现异常, 且在药物干预后其水平明显恢复。这说明异常的氨基酸代谢是惊厥的病理表现之一, CA 和 DCA 的抗惊厥作用与调节氨基酸代谢有关。

丁酸是由肠道菌群产生的一种短链脂肪酸, 具有重要的代谢调控功能, 可通过刺激胰高血糖素样肽-1 等肠道激素的产生参与体内糖脂代谢的调控^[26], 还可通过激活 G 蛋白偶联受体参与神经递质的产生和神经保护^[27-28]。本研究发现惊厥大鼠的丁酸代谢下调, 经 CA 和 DCA 治疗后, 丁酸代谢水平显著恢复, 提示丁酸等短链脂肪酸在惊厥的发生和发展中具有重要作用。

综上所述, 胆汁酸单体成分 CA 和 DCA 均能从多个方面发挥抗惊厥作用, CA 和 DCA 的抗惊厥作用与柠檬酸循环、氨基酸代谢和丁酸代谢通路的调节有关。在抗惊厥药效方面, CA 和 DCA 都具有药效活性, 但 DCA 的抗惊厥作用更强, 而 CA 和 DCA 作为胆汁代谢的次级代谢产物, 是机体内产生的内源性胆汁酸成分, 同肝、脑、肠等多系统具有密切的内在联系。本次研究仅对两个次级胆汁酸成分进行在抗惊厥方面研究, 对开发抗惊厥药物有一定的参考意义, 但仍需进一步深入研究验证, 为探寻惊厥发作机制, 多系统内在联系以及抗惊厥药物的开发提供更多的证据。

[参考文献]

- [1] SMITH D K, SADLER K P, BENEDUM M. Febrile seizures: risks, evaluation, and prognosis[J]. *Am Fam Physician*, 2019, 99(7): 445-450
- [2] LEUNG A K, HON K L, LEUNG T N. Febrile seizures: an overview[J]. *Drugs Context*, 2018, 7: 212536
- [3] MARTINOS M M, YOONG M, PATIL S, et al. Recognition memory is impaired in children after prolonged febrile seizures[J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 10): 3153-3164
- [4] SHEEHAN T, AMENGUAL-GUAL M, VASQUEZ A, et al. Benzodiazepine administration patterns before escalation to second-line medications in pediatric refractory convulsive status epilepticus [J]. *Epilepsia*, 2021, 62(11): 2766-2777
- [5] MASTRANGELO M, MIDULLA F, MORETTI C. Actual insights into the clinical management of febrile seizures[J]. *Eur J Pediatr*, 2014, 173(8): 977-982
- [6] 裴育莹, 程发峰, 谭 令, 等. 发酵技术炮制胆汁相关方药传统工艺概述[J]. *环球中医药*, 2020, 13(9): 1640-1644
- [7] 熊艳霞, 董梦依, 刘文君, 等. 现代中药发酵研究现状及思路[J]. *中国当代医药*, 2022, 29(28): 33-37
- [8] 张 睿. 丹参酮 II A 通过 BDNF-TrkB 信号通路调控癫痫大鼠认知功能及突触可塑性的机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020
- [9] 王江红. 化浊解毒疏肝方对戊四氮致痫大鼠学习记忆及 PI3K-AKT-GSK3 β 通路的影响[D]. 保定: 河北大学, 2021
- [10] 孙 苗, 何秀玲, 石琳琳, 等. 胆酸对代谢性炎症模型大鼠糖及脂代谢的影响[J/OL]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021 [2023-11-13]. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2021.01.0423
- [11] 郝浩扬. 脱氧胆酸(DCA)对小鼠金黄色葡萄球菌性乳腺炎的保护作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022
- [12] HUANG W X, YU F, SANCHEZ R M, et al. TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 68-77
- [13] 崔亚晨, 单丽倩, 单国顺, 等. 猪牛羊胆汁及其制成的胆南星药效作用对比研究[J]. *中药材*, 2021, 44(3): 586-592
- [14] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 269-279
- [15] 林 东, 连文昌, 郑立娴. 不同剂量丙戊酸钠防治小儿复杂性热性惊厥的效果分析[J]. *莆田学院学报*, 2020, 27(2): 53-56
- [16] RUSSELL D W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 137-174
- [17] 张晓静. 胆酸类成分稳定性及与蛋白相互作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014
- [18] WISHART D S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1819-1875
- [19] JOHNSON C H, IVANISEVIC J, SIUZDAK G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459
- [20] ZUCCOLI G S, SAIA-CEREDA V M, NASCIMENTO J M, et al. The energy metabolism dysfunction in psychiatric disorders postmortem brains: focus on proteomic evidence[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 493
- [21] SULLIVAN C R, O' DONOVAN S M, MCCULLUM-SMITH R E, et al. Defects in bioenergetic coupling in

- schizophrenia[J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(9): 739–750
- [22] YOSHIMI N, FUTAMURA T, BERGEN S E, et al. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis[J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(11): 1504–1510
- [23] TAKEHANA S, YOSHIDA H, OZAWA S, et al. The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 455: 68–74
- [24] MARTIN D, SWARTZWELDER H S. Ethanol inhibits release of excitatory amino acids from slices of hippocampal area CA1[J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 219(3): 469–472
- [25] SÁNCHEZ-LÓPEZ E, MARCOS A, AMBROSIO E, et al. Investigation on the combined effect of cocaine and ethanol administration through a liquid chromatography - mass spectrometry metabolomics approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 313–321
- [26] ZHAO Z H, WANG Z X, ZHOU D, et al. Sodium butyrate supplementation inhibits hepatic steatosis by stimulating liver kinase B1 and insulin-induced gene [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(3): 857–871
- [27] LIU J D, BAYIR H O, COSBY D E, et al. Evaluation of encapsulated sodium butyrate on growth performance, energy digestibility, gut development, and Salmonella colonization in broilers [J]. *Poult Sci*, 2017, 96(10): 3638–3644
- [28] 梁胜男, 柯楚新, 黄鹤, 等. 肠道内产丁酸细菌及其产物丁酸生理功能的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 948–959
- [收稿日期] 2023-11-10
(本文编辑: 戴王娟)

(上接第 603 页)

- [7] ZHOU R Y, ZHANG Q, XU P L. TBK1, a central kinase in innate immune sensing of nucleic acids and beyond [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(7): 757–767
- [8] YUM S, LI M H, FANG Y, et al. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- κ B that mediate immune defense against tumors and viral infections [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(14): e2100225118
- [9] FISCHER F A, MIESL F M, NIZAMI S, et al. TBK1 and IKK ϵ act like an off switch to limit NLRP3 inflammasome pathway activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(38): e2009309118
- [10] SPARRER K M J, GABLESKE S, ZURENSKI M A, et al. TRIM23 mediates virus-induced autophagy via activation of TBK1[J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2(11): 1543–1557
- [11] GHOSH M, SAHA S, BETTKE J, et al. Mutant p53 suppresses innate immune signaling to promote tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4): 494–508
- [12] REVACH O Y, LIU S M, JENKINS R W. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(11): 1065–1078
- [13] LI T, YUM S, LI M H, et al. TBK1 recruitment to STING mediates autoinflammatory arthritis caused by defective DNA clearance[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(1): e20211539
- [14] XIANG S, SONG S K, TANG H T, et al. TANK-binding kinase 1 (TBK1): an emerging therapeutic target for drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2445–2455
- [15] 宋宁, 陈相健, 王子盾, 等. NLRP3 炎症小体参与 HSV-1 诱导病毒性心肌炎的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(6): 699–704
- [16] WU R L, WANG N, COMISH P B, et al. Inflammasome-dependent coagulation activation in sepsis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 641750
- [17] DANIELSKI L G, GIUSTINA A D, BONFANTE S, et al. The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 24–31
- [收稿日期] 2023-11-22
(本文编辑: 陈汐敏)