

# 急性脊髓损伤模型大鼠血清和脊髓的代谢组学研究

胡华辉<sup>1</sup>, 黄小龙<sup>1</sup>, 全仁夫<sup>2</sup>, 杨宗保<sup>3</sup>, 许晶晶<sup>3</sup>

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市萧山区中医院, 浙江 杭州 311201; 3. 厦门大学中医系, 电子科学系, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 福建 厦门 361005)

**【摘要】** 目的: 采用 <sup>1</sup>H NMR 核磁共振代谢组学的方法研究急性脊髓损伤模型大鼠的代谢组学特征及生物标志物, 探讨核磁共振代谢组学应用于脊髓损伤研究的可行性。方法: 取 8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 体重(200±10) g, 按照随机数字法分为假手术组和模型组, 每组 10 只, 模型组采用改良的 Allens 法制作急性脊髓不完全损伤模型, 假手术组不损伤脊髓, 术后第 1、5、7 天采用 BBB 运动功能评分法进行行为学观察, 术后第 7 天收集脊髓组织作病理学观察, 核磁共振代谢组学对两组大鼠血清和脊髓样本进行代谢组学分析。结果: BBB 评分显示假手术组术后下肢运动无明显改变, 各时间点差异无统计学意义, 模型组大鼠术后双下肢呈迟缓性瘫痪, BBB 运动评分较低, 各时间点差异存在统计学意义, 两组运动功能评分在各时间点的差异均有统计学意义; 病理切片显示假手术脊髓结构正常, 神经分布均匀, 模型组脊髓组织结构紊乱, 神经元数目减少, 存在炎症细胞浸润和空腔坏死组织。代谢组学分析表明, 血清中极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、谷氨酰胺(glutamine)、柠檬酸(citrate)、二甲基甘氨酸(DMG)等物质和脊髓中谷胱甘肽(glutathione)、3-羟基丁酸(3-OH-butyrate)、N-乙酰天冬氨酸(NAA)、磷酸胆碱(GPC)、谷氨酸(glutamate)、抗坏血酸(ascorbate)等物质浓度有明显变化( $P < 0.05$ )。结论: 通过对假手术组和模型组大鼠血清和脊髓样本进行代谢组学检测和分析得到了两组样本的差异性代谢物质, 有助于解释急性脊髓损伤后血清和脊髓组织中的特异性小分子物质的变化规律, 为后期针对性地研究这些代谢标记物在急性脊髓损伤中的作用提供研究基础。

**【关键词】** 脊髓损伤; 核磁共振; 代谢组学;

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2017.02.012

## The metabolic profilings study of serum and spinal cord from acute spinal cord injury rats <sup>1</sup>H NMR spectroscopy

HU Hua-hui, HUANG Xiao-long, QUAN Ren-fu\*, YANG Zong-bao, and XU Jing-jing. \*Xiaoshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311201, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To establish the rat model of acute spinal cord injury, followed by a primary study on this model with <sup>1</sup>H NMR based on metabolomics and to explore the metabolomics and biomarkers of spinal cord injury rat. **Methods:** Twenty eight-week-old adult male SD rats of clean grade, with body weight of (200±10) g, were divided into sham operation group and model group in accordance with the law of random numbers, and every group had 10 rats. The rats of sham operation group were operated without damaging the spinal cord, and rats of model group were made an animal model of spinal cord incomplete injury according to the modified Allen's method. According to BBB score to observe the motor function of rats on the 1th, 5th, and 7th days after surgery. Postoperative spinal cord tissue was collected in order to pathologic observation at the 7th day, and the metabolic profilings of serum and spinal cord from spinal cord injury rats were studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Results:** The hindlimb motion of rats did not obviously change in sham operation group, there was no significant difference at each time point; and rats of model group occurred flaccid paralysis of both lower extremities, there was a significant difference at each time; there was significant differences between two groups at each time. Pathological results showed the spinal cord structure was normal with uniform innervation in sham group, while in model group, the spinal cord structure was messy, and the neurons were decreased, with inflammatory cells and necrotic tissue. Analysis of metabolomics showed that concentration of very low density fat protein (VLDL), low density fat protein (LDL), glutamine, citric acid, dimethylglycine (DMG) in the serum and glutathione, 3-OH-butyrate, N-Acetyl-L-aspartic acid (NAA), glycerophosphocholine (GPC), glutamic acid, and ascorbate in spinal cord had significant changes ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** There are significant differences in metabolic profile from

基金项目: 浙江省自然科学基金(编号: LY15H270003); 浙江省中医药科技计划项目(编号: 2015ZZ017)

Fund program: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY15H270003)

通讯作者: 全仁夫 E-mail: quanrenf@263.net.

Corresponding author: QUAN Ren-fu E-mail: quanrenf@263.net

serum and spinal cord sample between model group and sham operation group, it conduces to explain the changes of small molecular substances in serum and spinal cord tissue after spinal cord injury, this provides the research basis for targeted research on the role of metabolic markers in patients with acute spinal cord injury.

**KEYWORDS** Spinal cord injury; Nuclear magnetic resonance; Metabonomics

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(2): 152-158 www.zggszz.com

急性脊髓损伤造成二便功能和运动功能障碍是全球医学界亟待解决的重大医学问题之一<sup>[1]</sup>。研究表明早期脊髓损伤与修复过程中有许多酶参与,且涉及多条代谢途径包括糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢和核酸代谢等<sup>[2]</sup>。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后一门新兴的学科,通过分析代谢终端产物的变化,分析疾病的特征性代谢产物<sup>[3-5]</sup>。外界刺激会对机体的代谢网络产生影响,使得细胞代谢产生的内源性物质的种类、浓度等发生改变。目前,尚未见应用<sup>1</sup>H NMR 代谢组学的方法来研究急性脊髓损伤的文献报道,本课题组于 2015 年 9 月至 2016 年 7 月,采用假手术对照组和模型组对比的方式,控制除造模外的其他外部条件对两组大鼠影响一致的情况下,研究急性脊髓损伤大鼠早期机体代谢的物质变化,结合多元数据统计分析方法,旨在筛选出急性脊髓损伤大鼠的差异性代谢产物,阐明这些差异代谢产物所对应的代谢改变,为从整体的、系统的代谢水平探讨脊髓损伤疾病提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级雄性 8 周龄 SD 大鼠 20 只均购自厦门大学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(闽)2008-0001,体重(200±10)g,适应性饲养 1 周后随机分为假手术组和模型组,动物房恒定温度 20~22℃、相对湿度 45%~65%,光-暗周期 12 h,分笼饲养,给予充足的饲料和清洁水。

### 1.2 试剂与仪器

水合氯醛(上海国药集团);青霉素(河北远征药业);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司);异氟醚、氙代氯仿、重水(均为美国 Sigma-Aldrich 公司);低温高速离心机(美国 Thermo 公司);SCIENZ-48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);D29-6020 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);冷冻干燥机(北京博医康试验仪器有限公司);Varian 500MHz 超导核磁共振谱仪(美国 Varian 公司)。

### 1.3 造模方法

手术器械高压蒸汽消毒,术前禁食 12 h,常规 10%的水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉后,腰背部脱毛,无菌条件下暴露 T<sub>9</sub>-T<sub>10</sub> 节段 0.5 cm 宽硬膜,模型组采用改良的 Allens 造模法<sup>[6-7]</sup>,致伤量为

60 g/cm,假手术组只打开 T<sub>9</sub>-T<sub>10</sub> 节段椎管,不损伤脊髓。模型成功的标准:打击时大鼠出现甩尾反射,双下肢扑动,麻醉苏醒后,双下肢呈迟缓性瘫痪, BBB 评分为 0 分。术后采用 Crede 手法<sup>[8]</sup>下腹部挤压膀胱人工排尿,每日 3~4 次。

### 1.4 实验取材

结合血液代谢周期规律,在术后 7 d 取材,取材前禁食 12 h(不禁水),用异氟醚麻醉后尾动脉采集血液 1 ml,注射器和针头用肝素钠溶液浸润,加入 0.5 ml 2% NaN<sub>3</sub> 溶液做防腐剂,4℃,4 000 r/min 离心 10 min,吸取血清样本装入冻存管,先在液氮中冻存 30 s,然后放入-80℃冰箱保存。在冰盘上迅速取出受损脊髓上下长 1.5 cm,以损伤处为中心,分两部分存放,将上部脊髓组织生理盐水洗净后置于 10%多聚甲醛中固定,另一段先在液氮中冻存 30 s,然后放入-80℃冰箱保存。

### 1.5 观察项目及方法

**1.5.1 大鼠体重记录** 观察并记录大鼠的一般情况,在术前 1 d 早上 8 点统一对大鼠进行体重测量,术后第 5、7 天相同时间段测量大鼠体重并记录,模型组大鼠先协助排空膀胱后再测量体重。

**1.5.2 大鼠行为学观察** 假手术组大鼠术后活动未受明显影响,脊髓损伤大鼠活动量明显减少,两组大鼠均无死亡。采用 BBB 运动功能评分法<sup>[9]</sup>,对大鼠后肢运动功能进行评价,评分范围为 0~21 分,0 分时无可见后肢运动,2 分以下只有 1~2 个关节的轻微活动,根据关节活动度及躯干协调性确定得分,至 20 分时可持续性掌面移动,步态协调,足趾持续抓地,而躯干稳定性较差。脊髓损伤后评分>2 分及假手术组评分<20 分均提示造模失败。根据大鼠夜晚活动的习性,评分均在晚上 7 点进行,评分前先协助大鼠排空膀胱,以免因膨大的膀胱而影响功能活动。评分采用双人双盲的方式进行,评分者对评分法则熟悉且非本组成员,每只大鼠观察 3 min,重复 2 次,取平均值,分别在术前、术后 5 d 和术后 7 d 进行评分。

**1.5.3 大鼠脊髓组织病理学观察** 脊髓组织用生理盐水洗净后置于 4%的多聚甲醛中,4℃过夜固定,修整组织块,不同浓度乙醇脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚 3~5 μm,每组取 3 张于 60℃恒温箱内烤片 4 h。二甲苯脱蜡。梯度酒精水化,流水冲洗,苏

木精液染色 5 min, 流水稍洗去苏木精液 1~3 s, 1% 盐酸乙醇 1~3 s, 流水过洗至返蓝, 伊红复染, 脱水, 中性树胶封片, 于光镜下观察。

**1.5.4 磁共振检测** (1) 血清核磁共振检测: 取 400 μl 血清样品, 加入磷酸盐缓冲液将 pH 值调至 7.4; 同时加入 0.3 mMTSP 作为定标物, 混合均匀后, 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 550 μl 移入 5 mm NMR 管, 在 Varian 500 MHz 谱仪上进行血清的核磁共振检测。(2) 大鼠脊髓组织的核磁共振检测: 取脊髓组织 200 mg 绞碎, 匀浆, 取 100 μl, 放入匀浆瓶中, 依次加入 400 μl 甲醇和 125 μl 去离子水, 用匀浆机于 0 °C 下匀浆 30 s, 依次加入 400 μl 氯仿和 400 μl 去离子水后, 混匀器混匀 60 s, 于冰上静置分离 10 min。将混合液移至 1.5 ml 的玻璃离心管中, 4 °C, 10 000 r/min, 离心 5 min。取出上层清液, 转移入洁净的试剂管中, -40 °C 冰箱冷冻 3 h 后, 置于冻干机冷冻干燥 24 h 以除去甲醇、水和氯仿溶剂。实验时移入 5 mm NMR 管, 在 Varian 500 MHz 谱仪上进行脊髓组织的核磁共振检测, <sup>1</sup>H 核磁共振谱的代谢产物赋值根据核磁共振数据库<sup>[10]</sup>和 HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>)。

**1.6 统计学处理**

样品的 <sup>1</sup>H NMR 数据均由 MestReNova 软件 (V. 8.1.2 Mestrelab Research S.L.) 完成。包括谱图信号去噪、基线和相位校正, 数据分段积分、行和列归一化以及尺度标准化处理。对血清和脊髓数据集分别进

行偏最小二乘判别式 (PLSDA) 分析。采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理, 数据以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 组内 3 个时间段的比较采用重复测量方差分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 一般观察**

模型组大鼠术后活动量、进食量明显减少, 毛发颜色失去光泽, 假手术组在术后第 2 天时饲料和水的消耗量已恢复到术前水平, 两组大鼠不同时间点的体重差异有统计学意义, 即存在时间效应。术后 1、5 d 两组大鼠的体重比较, 差异无统计学意义; 术后 7 d 假手术组的平均体重大于模型组。分组因素和时间因素间存在交互效应, 见表 1。

**2.2 大鼠运动功能评分**

假手术组因未损伤脊髓, 后肢运动无障碍, 术后 1、5、7 d 时间点的评分差异无统计学意义。模型组大鼠双下肢呈迟缓性瘫痪, BBB 运动评分较低, 从 1、5、7 d 时间点的评分可见后肢运动功能存在恢复趋势, 且各时间的差异有统计学意义。术后 1、5、7 d 模型组运动功能明显低于假手术组。分组因素和时间因素间存在交互效应, 见表 2。

**2.3 大鼠脊髓组织病理学**

假手术组大鼠未损伤脊髓组织, 镜下可见脊髓形态结构完整, 神经细胞分布均匀, 形态正常, 胶质细胞散在均匀。模型组损伤明显, 损伤局部正常结构

表 1 假手术组与模型组大鼠体重质量变化比较 ( $\bar{x}\pm s, g$ )

Tab.1 Comparison of average body mass changes in rats between shame operation group and model group ( $\bar{x}\pm s, g$ )

组别	鼠数(只)	术前 1 d	术后 5 d	术后 7 d	F 值	P 值
假手术组	10	202.90±6.91	211.8±6.90	225.90±9.39	150.12	0.000
模型组	10	204.60±8.14	207.3±5.7	217.40±5.75	31.65	0.000
<i>t</i> 值	-	0.503	1.570	2.439	<i>F</i> =11.316 <sup>#</sup>	
<i>P</i> 值	-	0.621	0.134	0.025	<i>P</i> =0.000 <sup>#</sup>	

注: <sup>#</sup> 交互效应的 *F* 值和 *P* 值

Note: <sup>#</sup> Represents the *F* and *P* values are interaction effects between two groups

表 2 假手术组与模型组大鼠 BBB 运动功能评分比较 ( $\bar{x}\pm s, 分$ )

Tab.2 Comparison of BBB grade of motor function in rats between shame operation group and model group ( $\bar{x}\pm s, score$ )

组别	鼠数(只)	术后 1 d	术后 5 d	术后 7 d	F 值	P 值
假手术组	10	20.6±0.52	20.7±0.48	20.8±0.42	0.863	0.439
模型组	10	0.40±0.52	1.2±0.42	2.10±0.56	26.75	0.000
<i>t</i> 值	-	86.14	96.17	83.62	<i>F</i> =9.123 <sup>#</sup>	
<i>P</i> 值	-	0.000	0.000	0.000	<i>P</i> =0.001 <sup>#</sup>	

注: <sup>#</sup> 交互效应的 *F* 值和 *P* 值

Note: <sup>#</sup> Represents the *F* and *P* values are interaction effects between two groups

丧失,神经细胞数目减少,存在较大空腔,胶质细胞增生,局部炎性细胞细胞浸润。见图 1。

2.4 大鼠血清代谢轮廓比较

图 2 为大鼠血清代表性 <sup>1</sup>H NMR 谱,图 3a 得分图可见两组血清有明显的分组差异,R<sup>2</sup>X 和 Q<sup>2</sup> 用来描述模型质量,R<sup>2</sup>X 定义为由模型解释的数据比例及拟合优度,Q<sup>2</sup> 定义为由模型在数据预中的比例及其预测性,血清模型的预测能力(Q<sup>2</sup>)为 0.962,说明两组间的代谢差异有统计学意义,R<sup>2</sup>X 为 0.562,说明组间差异信息占数据集总方差比例比较高,图 3b 为图 3a 对应的得分图,两端的物质表示对分组贡献

较大的物质。

2.5 大鼠血液代谢物变化

模型组大鼠血液中极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、谷氨酰胺(glutamine)、柠檬酸(citrate)、二甲基甘氨酸(DMG)、丙二酸(malonnate)、甜菜碱(betaine)、丙三醇(glycerol)等代谢物质浓度与假手术组相比均有所降低,而肌酸(creatine)相对于假手术组有所升高,差异均具有统计学意义,见表 3。

2.6 大鼠脊髓组织代谢轮廓比较

图 4 为大鼠脊髓的典型 <sup>1</sup>H NMR 谱图,图 5a 得

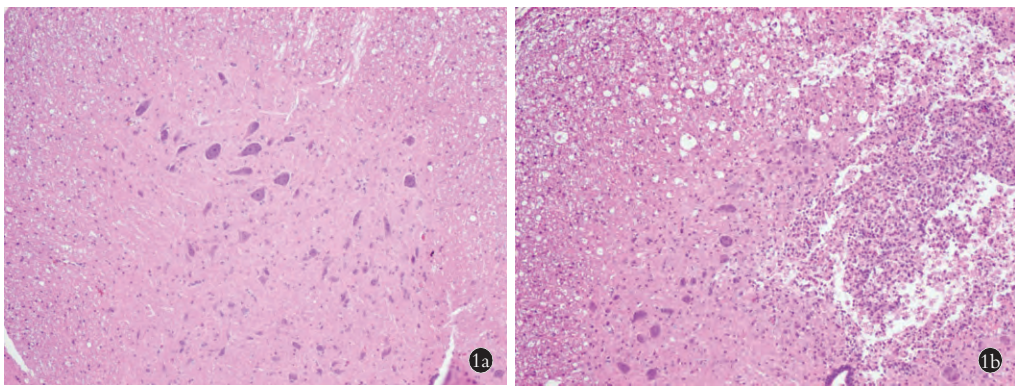


图 1 各组大鼠脊髓组织病理切片图(HE×100) 1a.假手术组脊髓组织结构和神经细胞正常 1b.模型组组织结构紊乱、炎性浸润

Fig.1 Pathological sections of spinal cord tissue in each group (HE×100) 1a. The spinal cord tissue structure and nerve cells were normal in sham operation group 1b. The spinal cord tissue structure was messy with inflammatory infiltration in medull group

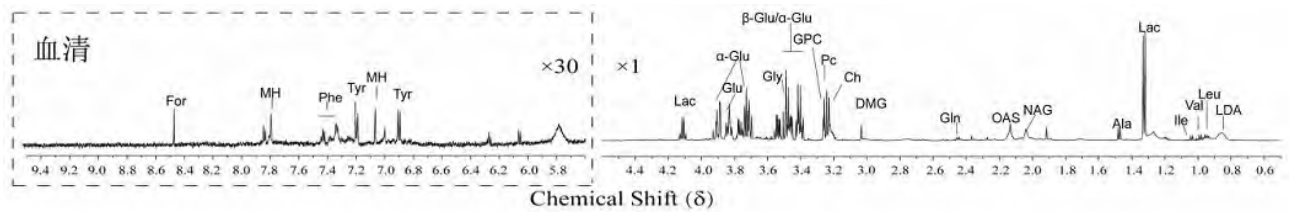


图 2 SD 大鼠血清典型 <sup>1</sup>H NMR 谱图

Fig.2 Typical <sup>1</sup>H NMR spectra of serum from SD rat

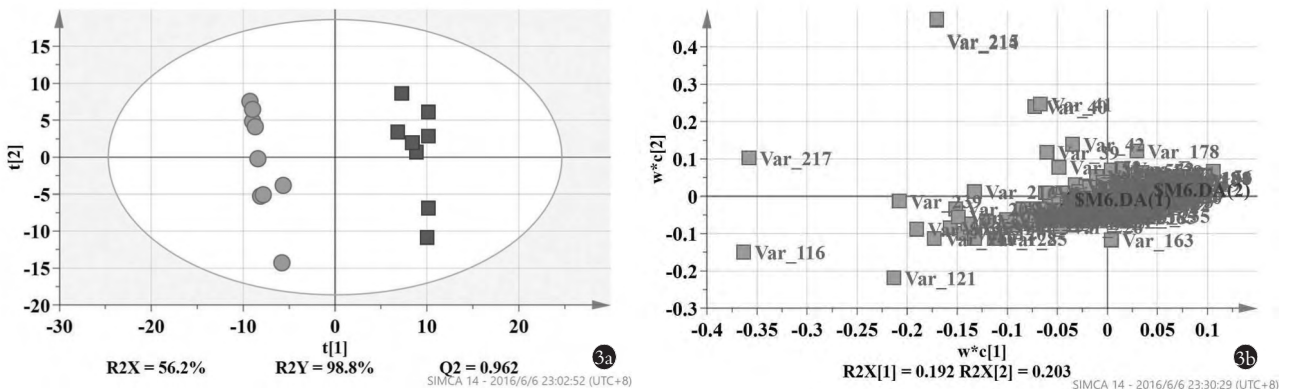


图 3 假手术组与模型组代谢轮廓比较 3a.假手术组与模型组血清样本得分图 3b.血清样本载荷图 ●假手术组 ■模型组

Fig.3 Comparison metabolic profile of serum for sham operation group and model group 3a. The score figure of metabolomics data for sham operation group and model group 3b. Loading chart of serum sample ● was sham operation group and ■ was model group

表 3 模型组大鼠血液代谢物变化

Tab.3 Changes of blood metabolites in model group

化学位移 $\delta$ ( $^1\text{H NMR}$ )	化学物质	变化趋势 ( $P < 0.05$ )
1.26	极低密度脂蛋白	↓
1.34	低密度脂蛋白	↓
2.46	谷氨酰胺	↓
2.54, 2.65	柠檬酸	↓
2.91	二甲基甘氨酸	↓
3.02, 3.09	肌酸	↑
3.12	丙二酸	↓
3.25	甜菜碱	↓
3.38	丙三醇	↓

注: ↓表示浓度降低, ↑表示浓度升高,  $P < 0.05$  表示与假手术组比较差异有统计学意义

Note: Compared with the sham group, ↓ indicated decreased concentration, ↑ indicated increased concentration,  $P < 0.05$  represents a statistically significant between two groups

分图可见两组脊髓组织有明显的分组差异, 模型的  $Q^2$  和  $R^2X$  分别高达 0.843 和 0.611, 说明组间差异信息占数据集总方差比例比较高, 图 5b 为图 5a 对应的载荷图。

### 2.7 大鼠脊髓代谢物变化

模型组大鼠脊髓代谢物中谷胱甘肽 (glutathione)、3-羟基丁酸 (3-OH-butyrate)、N-乙酰天

冬氨酸 (NAA)、天冬酰胺 (asparagine)、抗坏血酸 (ascorbate)、三磷酸腺苷 (ATP) 等代谢物浓度较假手术组有所下降, 而甜菜碱 (betaine)、磷酸胆碱 (GPC)、谷氨酸 (glutamate)、乙醇胺 (ethanolamine)、天冬氨酸 (aspartate)、牛磺酸 (taurine)、腺苷/肌苷 (adenosine/inosine)、次黄嘌呤 (hypoxanthine) 等物质浓度较假手术组有所升高, 见表 4。

### 3 讨论

#### 3.1 脊髓损伤后与能量相关的代谢物变化

脊髓损伤组大鼠血清中极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、丙二醇和丙三醇浓度降低, 说明模型组大鼠发生了脂类代谢的紊乱, 导致血脂的降低和血脂清除率的增加<sup>[11-12]</sup>。二甲基甘氨酸浓度降低, 提示模型组大鼠氨基酸分解代谢水平低下, 蛋白质合成不足。柠檬酸和肌酸同样都是能量代谢的中间产物, 脊髓损伤后由于组织缺血缺氧, 三羧酸循环被抑制, 有氧代谢和无氧酵解紊乱失衡, 出现糖代谢紊乱, 机体能量失衡, 损伤组织可能是通过增加无氧酵解和肌酸代谢来维持自身的能量, 提示在脊髓损伤发生后必须注意纠正机体的能量代谢。

#### 3.2 脊髓损伤后与微环境相关的代谢物变化

抗坏血酸是体内抗氧化系统中的重要组成部分, 它能够使脂质过氧化物的含量降低, 清除脊髓损伤释放的自由基, 阻断脂质过氧化反应。谷胱甘肽是

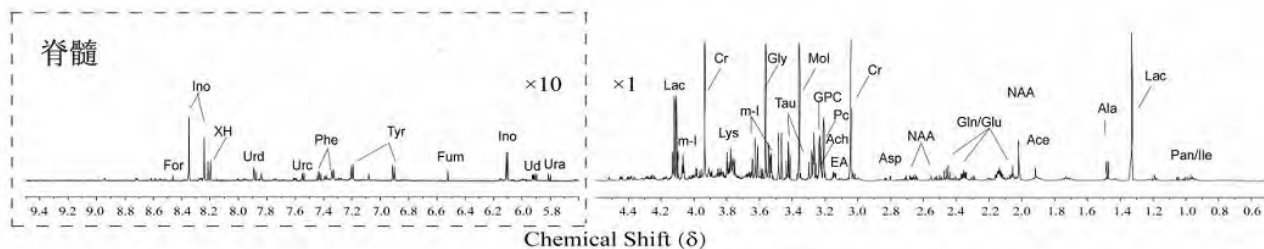


图 4 SD 大鼠脊髓的典型  $^1\text{H NMR}$  谱图

Fig. 4 Typical  $^1\text{H NMR}$  spectra of spinal cord tissue from SD rat

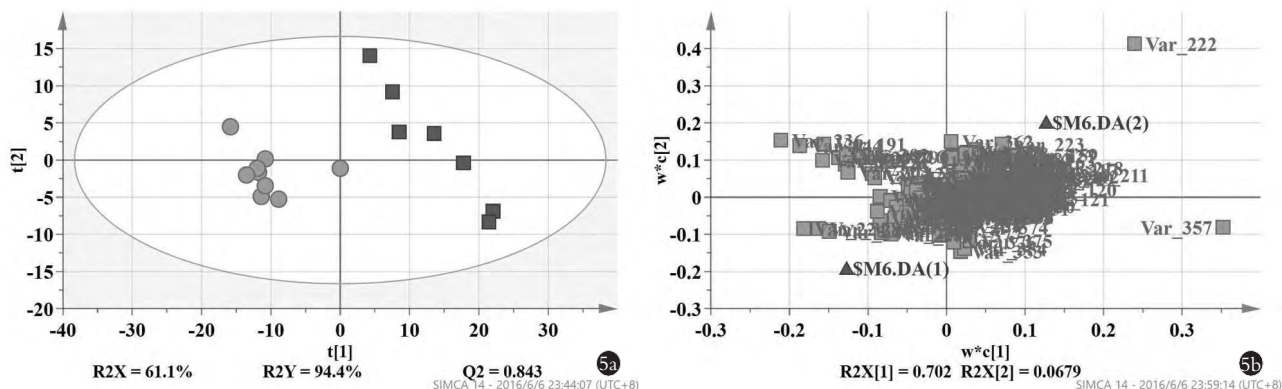


图 5 假手术组与模型组脊髓样本代谢轮廓比较 5a. 假手术组与模型组脊髓样本得分图 5b. 脊髓样本载荷图 ● 假手术组 ■ 模型组

Fig.5 Comparison of metabolic profile of spinal cord sample between sham operation group and model group 5a. The score figure of metabolomics data for sham operation group and model model 5b. Loading chart of spinal cord sample ● was sham operation group and ■ was model group

表 4 脊髓损伤组大鼠脊髓代谢物变化

Tab.4 Changes of spinal cord metabolites in model group

化学位移 $\delta$ ( $^1\text{H NMR}$ )	化学物质	变化趋势 ( $P<0.05$ )
2.191, 2.174	谷胱甘肽	↓
2.312, 2.299	3-羟基丁酸	↓
2.705, 2.674	N-乙酰天冬氨酸	↓
3.001	天冬酰胺	↓
3.277	甜菜碱	↑
3.677, 3.234	磷酸胆碱	↑
3.796, 3.785	谷氨酸	↑
3.826	乙醇胺	↑
3.907, 3.900	天冬氨酸	↑
4.054	抗坏血酸	↓
4.280, 3.412	牛磺酸	↑
4.451, 4.286	腺苷/肌苷	↑
4.628	三磷酸腺苷	↓
8.240	次黄嘌呤	↑

注: ↓ 表示浓度降低, ↑ 表示浓度升高,  $P<0.05$  表示与假手术组比较差异有统计学意义

Note: Compared with sham operation group, ↓ indicated decreased concentration, ↑ indicated increased concentration,  $P<0.05$  represents a statistically significant between two groups

真核细胞内的主要还原剂, 细胞内氧自由基的清除通常伴随着谷胱甘肽的减少。牛磺酸最主要的生理作用是抗氧化损伤作用<sup>[13]</sup>, 牛磺酸中的氨基能与氧化剂结合, 从而阻止了氧化作用的发生。它们与体内的其他抗氧化性物质一起构成了生物体内小分子抗氧化体系, 清除自由基对膜类脂质、蛋白质的损伤, 促进脊髓损伤的修复。

### 3.3 脊髓损伤后与细胞凋亡相关的代谢物变化

甜菜碱有调节组织渗透压的作用<sup>[14]</sup>, 脊髓损伤后组织渗透压的改变会使机体内环境发生显著变化, 甜菜碱是胆碱在机体不可逆的氧化代谢产物<sup>[15]</sup>, 胆碱是鞘磷脂的重要组成部分, 对细胞膜的完整性发挥着重要作用, 胆碱浓度的变化说明细胞完整性被破坏, 提示脊髓损伤后细胞发生了损伤, 细胞出现凋亡。脊髓代谢物中的乙醇胺和磷酸胆碱也参与磷脂代谢过程<sup>[16-17]</sup>, 对于维持线粒体及细胞功能有着重要作用, 能提示脊髓损伤后细胞的损伤情况。

### 3.4 脊髓损伤后与神经修复相关的代谢物变化

谷氨酰胺是重要的神经递质, 对于维持神经系统功能具有重要作用。谷氨酰胺是抗氧化分子-谷胱甘肽的前体, 并且在维持机体酸碱平衡、调节机体免疫机能以及物质和能量代谢等方面发挥作用。天冬氨酸和谷氨酸都是重要的神经递质, 对于维持神经系统功能具有重要作用。而天冬氨酸和谷氨酸属于

兴奋性氨基酸类神经递质, 其浓度过高会对神经系统产生兴奋性毒性作用, 加重神经元的死亡<sup>[18]</sup>。

N-乙酰天冬氨酸(NAA)被看作是神经元及其功能完整性的标志<sup>[19]</sup>, 在神经元损伤或能量代谢失调的疾病中可见 NAA 含量减少, 其含量会随着神经症状的变化发生相应的改变<sup>[20]</sup>。3-羟基丁酸可诱导神经干细胞向神经元方向分化, 能够为神经胶质细胞提供能量, 并且能够不同程度的抑制神经胶质细胞的凋亡<sup>[21-22]</sup>。

腺苷是中枢神经中的内源性保护因子, ATP 脱磷酸作用是腺苷形成的主要途径之一, 腺苷能够减轻血管损伤和抑制兴奋性神经递质的释放<sup>[23]</sup>。脊髓损伤后 ATP 生成减少, 腺苷的合成受到限制, 腺苷通过腺苷脱氨酶代谢为肌苷, 肌苷进一步代谢为次黄嘌呤。本实验研究发现脊髓损伤后 ATP 减少, 腺苷/肌苷浓度明显升高, 可能是中枢神经系统自我保护的表现。

综上, 本实验通过代谢组学的方法对脊髓损伤大鼠进行了初步研究, 例证了代谢组学方法用于研究脊髓损伤的可行性, 本文鉴定出的差异性代谢物质涉及到了细胞凋亡、能量代谢和神经修复等方面, 与脊髓损伤的继发性损害密切相关, 下一步针对现已明确的特异性的代谢标志物, 本课题组将进一步研究在电针治疗下相关关键节点蛋白的表达状况。与传统实验单指标方法相比, 代谢组学能够全面、整体分析脊髓损伤所导致的机体改变, 能系统地反应各项生理变化, 其应用于脊髓损伤的研究能够在脊髓损伤生理变化的研究与治疗手段的评估中起到更大的作用。

### 参考文献

- [1] Chen CY, Chuang TY, Tsai YA, et al. Loss of sympathetic coordination appears to delay gastrointestinal transit in patients with spinal cord injury[J]. Dig Dis Sci, 2004, 49(5): 738-743.
- [2] Peng J, Zeng J, Cai B, et al. Establishment of quantitative severe evaluation model for spinal cord injury by metabolome fingerprinting [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93736.
- [3] Klupczyńska A, Dereziński P, Kokot ZJ. Metabolomics in medical sciences-trndcs, challenges and perspectives [J]. Acta Pol Pharm, 2015, 72(4): 629-641.
- [4] Yu M, Cui FX, Jia HM, et al. Aberrant purine metabolism in allergic asthma revealed by plasma metabolomics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 120: 181-189.
- [5] Kanehisa M. KEGG Bioinformatics Resource for Plant Genomics and Metabolomics [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1374: 55-70.
- [6] Khart T, Havey RM, Sayers ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries [J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2): 161-172.
- [7] 李长明, 谢尚举, 王拓, 等. 电针对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡及相关功能的影响 [J]. 中国骨伤, 2015, 28(8): 733-737.
- LI CM, XIE SJ, WANG T, et al. Electroacupuncture effect on the apoptosis of neural cells and related function in rats after acute

spinal cord injury [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8): 733-737. Chinese with abstract in English.

[8] Royo MV, Canales CL, Moreno FG, et al. Urinary retention in immunocompetent patient: acute transverse myelitis [J]. An Sist Sanit Navar, 2011, 34(3): 523-526.

[9] Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score [J]. J Neurotrauma, 2002, 19(10): 1251-1260.

[10] Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, et al. 750 MHz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease [J]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15(11): 1647-1659.

[11] Jiang H, Peng J, Zhou ZY, et al. Establishing <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance based metabonomics finger printing profile for spinal cord injury: a pilot study [J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(17): 2315-2319.

[12] Meuwese CL, Dekker FW, Lindholm B, et al. Baseline levels and trimestral variation of triiodothyronine and thyroxine and their association with mortality in maintenance hemodialysis patients [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2012, 7(1): 131-138.

[13] Vang S, Longley K, Steer CJ, et al. The unexpected uses of ursolic and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases [J]. Glob Adv Health Med, 2014, 3(3): 58-69.

[14] Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, et al. An NMR-based metabolomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk: ApfCD mouse [J]. FEBS Lett, 2000, 484(3): 169-174.

[15] Zhang M, Zhang H, Li H, et al. Antioxidant Mechanism of Betaine without Free Radicals Scavenging Ability [J]. J Agric Food Chem, 2016, PMID: 27677203. [Epub ahead of print].

[16] Salek RM, Maguire ML, Bentley E, et al. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human [J]. Physiol Genomics, 2007, 29(2): 99-108.

[17] Piao S, Cha YN, Kim C. Taurine chloramine protects raw 264.7 macrophages against hydrogen peroxide-induced apoptosis by increasing antioxidants [J]. J Clin Biochem Nutr, 2011, 49(1): 50-56.

[18] Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Glutamate increases in vitro survival and proliferation and attenuates oxidative stress-induced cell death in adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells via non-NMDA ionotropic glutamate receptors [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(16): 1223-1233.

[19] Wooltla B, Denic A, Watzlawik JO, et al. A single dose of a neuron-binding human monoclonal antibody improves brainstem NAA concentrations, a biomarker for density of spinal cord axons, in a model of progressive multiple sclerosis [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 83.

[20] Goncalves S, Stevens TK, Doyle-Petty P, et al. N-acetylaspartate in the motor and sensory cortices following functional recovery after surgery for cervical spondylotic myelopathy [J]. J Neurosurg Spine, 2016, 25(4): 436-443.

[21] 卢晓云, 杨志倩, 吕海侠, 等. 3-羟基丁酸对体外培养大鼠皮质神经干细胞增值分化的影响 [J]. 西安交通大学学报, 2012, 33(6): 689-692.

LU XY, YANG ZQ, LYU HX, et al. The effect of 3-Hydroxy-butyric acid on rat cortical of value-added differentiation of neural stem cells cultured in vitro [J]. Xi An Jiao Tong Da Xue Xue Bao, 2012, 33(6): 689-692. Chinese.

[22] Xiao XQ, Zhao Y, Chen GQ, et al. The effect of 3-hydroxybutyrate and its derivatives on the growth of glial cells [J]. Biomaterials, 2007, 28(25): 3608-3616.

[23] Li B, Qi S, Sun G, et al. Leptin suppresses adenosine triphosphate-induced impairment of spinal cord astrocytes [J]. J Neurosci Res, 2016, 94(10): 924-935.

(收稿日期: 2016-10-18 本文编辑: 王宏)

## 广告目录

- 1. 云南白药膏 (云南白药集团无锡药业有限公司) ..... (封 2)
- 2. 曲安奈德注射液 (昆明积大制药股份有限公司) ..... (对封 2)
- 3. 金乌骨通胶囊 (贵州盛世龙方制药股份有限公司) ..... (对中文目次 1)