

• 药理与临床 •

基于¹H-NMR代谢组学复方柴归方干预抑郁模型大鼠血清代谢物规律分析刘少博¹, 许 腾¹, 高 耀¹, 高晓霞^{1,2}, 周玉枝^{1,2}, 田俊生^{1,2*}, 秦雪梅^{1,2*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 采用¹H-NMR代谢组学方法分析复方柴归方干预抑郁模型大鼠血清代谢物组的变化规律。**方法** 采用慢性温和不可预知应激(CUMS)程序对大鼠进行造模,以复方柴归方及阳性药(文拉法辛)为干预药物,采用核磁共振方法对大鼠血清进行分析,数据预处理后导入SIMCA-P 14.1软件进行多元统计分析,从小分子代谢物角度对复方柴归方的抗抑郁药效进行验证,并寻找出潜在的疾病生物标志物和药物疗效标志物。**结果** CUMS抑郁大鼠模型复制成功,代谢组学结果表明与模型组相比,CUMS抑郁大鼠经阳性药和复方柴归方干预后血清中异亮氨酸、氧化三甲胺和肌酸水平升高,N-乙酰糖蛋白、胆碱和葡萄糖水平降低,差异显著($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 复方柴归方干预后CUMS模型大鼠血清差异代谢物水平明显回调,该研究可为复方柴归方抗抑郁作用机制研究提供参考依据。

关键词: 复方柴归方; 抑郁症; 代谢组学; 慢性温和不可预知应激; 抑郁模型; 内源性代谢物

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0097-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.016

¹H-NMR metabolomics analysis of changes of serum metabolites in rats with depression induced by Compound Chaigui Prescription

LIU Shao-bo¹, XU Teng¹, GAO Yao¹, GAO Xiao-xia^{1,2}, ZHOU Yu-zhi^{1,2}, TIAN Jun-sheng^{1,2}, QIN Xue-mei^{1,2}

1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Province Key Laboratory of Research and Utilization of Functional Substances in Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To analyze the effect of Compound Chaigui Prescription on the changes of serum metabolites in rats with depression by ¹H-NMR metabolomics. **Methods** Rats model established were modeled by chronic mild unpredictable stress (CUMS) procedure. Compound Chaigui Prescription and positive drugs (venlafaxine) were used as intervention drugs. Rat serum was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) method. After data pretreatment, SIMCA-P 14.1 software was introduced for multivariate statistical analysis to verify the antidepressant efficacy of Compound Chaigui Prescription from the perspective of small molecule metabolites, and find potential disease biomarkers and drug efficacy markers. **Results** The CUMS depression rat model was successfully replicated. The metabolomics results showed that the levels of isoleucine, trimethylamine oxide, and creatine in the serum of CUMS-depressed rats were significantly higher than those of the model group. The levels of N-acetyl-glycoprotein, choline, and glucose were decreased with a significant difference ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The serum metabolite levels in CUMS model rats were significantly corrected after Compound Chaigui Prescription intervention. This study can provide reference for the study of antidepressant mechanism of Compound Chaigui Prescription.

Key words: Compound Chaigui Prescription; depression; metabolomics; chronic unpredictable mild stress; depression model; endogenous metabolites

收稿日期: 2018-08-07

基金项目: 国家科技重大专项课题(2017ZX09301047); 中国博士后科学基金面上资助项目(2016M602414); 山西省科技重点研发计划(201603D3113013, 201603D321077); 山西省重点实验室项目(201605D111004); 山西省科技创新重点团队项目(201605D131045-18)

作者简介: 刘少博(1993—), 男, 河南商丘人, 硕士在读, 研究方向为中药药理。Tel: 15735652079 E-mail: 15735652079@163.com

***通信作者** 田俊生(1980—), 男, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0351)7019297 Fax: (0351)7018379 E-mail: stian@sxu.edu.cn

秦雪梅(1964—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中医药代谢组学。Tel: (0351)7011501 Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要临床特征的精神情感障碍性疾病, 终身患病率高达 17%^[1], 世界卫生组织在 2017 年的最新报告中指出, 目前全球大约有 3.2 亿人患有抑郁症, 发病率高达 4.4%, 我国抑郁症发病率约为 4.2%, 预计到 2020 年, 抑郁症将会成为严重威胁人类健康的第二大疾病, 仅次于心脑血管疾病^[2]。

代谢组学是继基因组学、蛋白组学和转录组学之后出现的一门新兴的“组学”, 是生物体在病理生理刺激和遗传因素改变的条件下, 在多个时间, 不同方位定量定性检测其代谢物变化, 测定整个机体的代谢图谱, 解释代谢物的变化规律, 全面理解代谢物在病理条件下的变化过程和代谢途径的一门学科^[3]。代谢组学研究中一般采用核磁共振 (NMR)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 等具有高通量、高灵敏度和高精密度的分析技术, 分析细胞、组织等生物样本中的内源性代谢物变化过程, 同时通过其动态变化来分析研究对象的病理生理状态。代谢组学为中药新药研发、中药复方安全性评价、药效物质基础和作用机制研究提供了强有力的技术支持^[4-7]。NMR 技术不需要对样品进行前处理, 且对样本无破坏是目前唯一可以用于活体研究的分析技术^[8], 目前, 基于 NMR 分析手段的代谢组学已经成为一种强有力的工具^[9]。

本课题组前期通过系统溶剂提取法、药效学验证和化学成分指纹图谱分析, 发现逍遥散低极性部位抗抑郁作用显著, 并通过药效成分归属和逍遥散临床观察进行处方化裁, 得到了优选复方柴归方, 该方由柴胡、当归、白芍、炒白术、炙甘草、薄荷 6 味中药组成^[10]。本研究制备大鼠温和慢性不可预知应激 (CUMS) 抑郁模型, 采用基于 NMR 的代谢组学技术对大鼠血液代谢物的变化进行测定分析, 从小分子代谢物角度对复方柴归方各剂量组的抗抑郁药效进行评价和验证, 同时寻找出潜在的抑郁症疾病生物标志物和药物疗效标志物。

1 材料

1.1 动物

56 只成年雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 180~200 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2014-0001, 动物置于自然节律光照环境下, 适应性饲养 1 周, 室温 22~24 °C, 相对湿度 35%~55%。

1.2 药品与试剂

中药饮片柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、炒白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.、炙甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 均购于山西省华阳药业有限公司, 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定均为正品, 鉴定结果符合《中国药典》2015 年版规定; 重水 (D₂O, 美国默克试剂公司); 盐酸文拉法辛胶囊 (25 mg/粒, 批号 140805, 成都康弘药业集团股份有限公司)。

1.3 仪器

Centrifuge TDL-5 低温高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); BSA124S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); 大鼠旷场测试箱 (长 100 cm、宽 100 cm、高 80 cm), 黑色, 25 格, 实验室自制; KQ2200DB 超声仪 (昆山超声仪器有限公司); Bruker 600 MHz AVANC III 核磁共振检测仪 (德国布鲁克公司)。

2 方法

2.1 复方柴归方提取物的制备

按复方柴归方处方配比 (柴胡-白芍-当归-炒白术-炙甘草-薄荷 6:6:6:6:3:2) 取适量药材, 加 8 倍量 75%乙醇, 加热回流 2 次, 每次 2 h, 药渣 8 倍量水提取 2 次, 每次 2 h, 回收乙醇, 浓缩干燥; 将水提液浓缩至 1.10 g/mL (65 °C), 乙醇沉淀体积分数为 70%, 静置 48 h, 滤过, 回收乙醇, 浓缩干燥, 混合乙醇提取物和水提醇沉物, 减压浓缩干燥, 即得复方柴归方提取物 (芍药苷质量分数不少于 8.9 mg/g, 柴胡皂苷 a 质量分数不少于 2.5 mg/g)。

2.2 分组与给药

大鼠正常饲养适应 1 周后, 进行糖水训练和旷场实验测试, 根据大鼠体质量和实验结果, 将大鼠随机分为 7 组: 对照组、模型组、文拉法辛 (0.035 g/kg) 阳性对照组和复方柴归方高、中、低剂量 (生药 19.4、9.7、4.8 g/kg) 组, 联合用药 (复方柴归方+文拉法辛, 9.7 g/kg+0.035 g/kg) 组, 每组 10 只。各给药组均 ig 给药, 连续给药 28 d, 每日给药体积为 10 mL/kg, 其中对照组和模型组 ig 给予等体积蒸馏水。

2.3 CUMS 抑郁模型复制

结合本实验室对经典造模方法的改进措施, 改进造模方式, 9 种应激因子随机安排: (1) 禁食 24 h;

(2) 禁水 24 h; (3) 4 ℃冰水浴 5 min; (4) 超声刺激 3 h; (5) 45 ℃热刺激 10 min; (6) 足底电击, 电压 36 V; (7) 空瓶应激 1 h; (8) 夹尾 2 min; (9) 束缚 3 h。对照组每笼 5 只, 正常饲养; 其余各组单笼喂养, 并连续 28 d 给予应激, 每天随机 1 种刺激, 同种刺激不连续出现。所有组别大鼠每周均进行称体质量、糖水偏爱率和旷场实验测试。造模与给药同时进行。

2.4 样品收集与制备

实验第 29 天采集各组大鼠血清及组织样本, 采样前各组大鼠禁食不禁水处理 12 h。实验当天对大鼠称体质量, 按每只大鼠的体质量, ip 10% 水合氯醛 (5 mL/kg) 麻醉, 股动脉取血于 10 mL EP 管中, 冰上放置 20 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液置于 1.5 mL EP 管中, -80 ℃保存。

血清样品预处理: 将存于 -80 ℃的样本放于冰水混合物中解冻, 精密吸取 450 μ L 于 1.5 mL EP 管中, 再加入 350 μ L D₂O, 涡旋震荡 30 s, 4 ℃、13 000 r/min 低温高速离心 20 min, 吸取 600 μ L 上清液置于内径 5 mm 的核磁管中, 用于检测。

2.5 ¹H-NMR 检测与图谱处理

样品在 Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 仪上检测 (25 ℃)。采用 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列, 检测谱宽 7 149.2 Hz, 扫描次数为 64 次, FID 分辨率 0.188 Hz, 脉冲时间 9.95 s, 采样时间 4.554 8 s, 延迟时间 1.0 s, 采样间隔 40.5 s, 采样点为 32 768。

所有图谱采用 MestReNova 核磁图谱数据处理软件对血清 ¹H-NMR 图谱进行傅里叶转换, 然后进行相位、基线的调整, 以肌酐 (δ 3.04) 为标准对图谱进行化学位移校正, 切除 δ 4.30~5.16 区间的水

峰, 以 0.01 为单位对 δ 0.70~8.60 的核磁图谱做等宽度分割进行分段积分, 并对数据进行归一化处理。将上述数据保存在 Excel 表格中, 用于多元统计分析。

运用 SIMCA-P14.1 将积分数据进行中心化和规格化处理后, 采用偏最小二乘法 (PLS-DA) 进行组间比较和模型验证; 采用正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 方法找出组间差异代谢物。使用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 5 对潜在生物标志物进行统计分析和图表绘制, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行差异比较。

3 结果

3.1 ¹H-NMR 图谱的指认与分析

参考文献报道^[11-12]及化合物数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 和 BMRB (<http://www.bmrwisc.edu/>) 中代谢物的信息, 并结合本实验大鼠血清核磁图谱峰形, 对大鼠血清中的代谢物进行指认, 共指认出 24 种内源性代谢产物, 包括脂质、氨基酸、胆碱、糖蛋白等, 具体信息见图 1 和表 1。

3.2 多元统计分析

为进一步分析各组间内源性代谢物的差异, 对复杂数据降维处理后进行多元统计分析。采用有监督的 PLS-DA 方法对各组血清样本数据矩阵进行代谢轮廓分析, 分析结果见图 2。模型组与对照组沿 *t*[2] 轴明显分开, 表明 CUMS 抑郁模型复制成功; 复方柴归方各剂量组有远离模型组接近对照组的趋势, 表明复方柴归方对 CUMS 抑郁模型大鼠具有很好的治疗作用; 文拉法辛组分布在对照组附近, 距离模型组较远, 表明文拉法辛对 CUMS 模型大鼠的抑郁状态具有很好的治疗作用; 联合用药组与模型组明显分开并与对照组接近, 表明联合用药组对 CUMS 模型大鼠的抑郁状态具有很好的治疗作用。

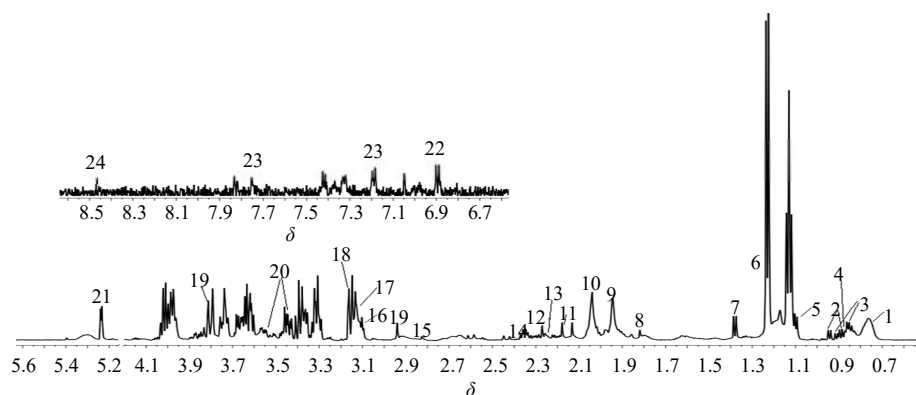


图 1 对照组大鼠血清样本 ¹H-NMR 图谱

Fig. 1 Typical ¹H-NMR spectrum of rat serum in control group

表 1 大鼠血清样本 $^1\text{H-NMR}$ 数据归属Table 1 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites in serum of rats

序号	代谢物	部分基团	δ_{H}
1	脂质	CH_3	0.87 (m)
2	缬氨酸	$\gamma\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_3$	0.99 (d, $J = 6.6$ Hz), 1.04 (d, $J = 7.2$ Hz)
3	异亮氨酸	$\delta\text{CH}_3, \delta\text{CH}_3, \delta\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_2$	0.94 (t, $J = 7.4$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.0$ Hz), 1.27 (m)
4	亮氨酸	$\text{CH}=\text{CH}$	0.96 (d, $J = 7.1$ Hz), 0.97 (d, $J = 6.6$ Hz)
5	β -羟丁酸	γCH_3	1.20 (d, $J = 6.6$ Hz), 2.41 (d, $J = 7.0$ Hz), 2.31 (d, $J = 6.0$ Hz)
6	乳酸	$\alpha\text{CH}, \beta\text{CH}_3$	1.33 (d, $J = 8.4$ Hz), 4.12 (q, $J = 8.3$ Hz)
7	丙氨酸	βCH_3	1.48 (d, $J = 8.6$ Hz)
8	乙酸盐	CH_3	1.92 (s)
9	<i>N</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.04 (s)
10	<i>O</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.14 (s)
11	乙酰乙酸	CH_3	2.28 (s)
12	丙酮酸	CH_3	2.37 (s)
13	谷氨酸	$\alpha\text{CH}, \beta\text{CH}_2$	2.06 (m), 2.35 (m)
14	谷氨酰胺	$\alpha\text{CH}, \beta\text{CH}_2$	2.14 (m), 2.46 (m)
15	二甲胺	NCH_3	2.93 (s)
16	胆碱	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.20 (s)
17	磷脂酰胆碱	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.21 (s)
18	氧化三甲胺	CH_3	3.26 (s)
19	肌酸	CH_3, CH_2	3.04 (s), 3.94 (s)
20	甘油	$\text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{OH}$	3.66 (dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz), 3.56 (dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz)
21	α -葡萄糖	1-CH	5.23 (d, $J = 4.2$ Hz)
22	酪氨酸	3 or 5-CH, 2 or 6-CH	6.89 (d), 7.18 (m)
23	组氨酸	2-CH, 4-CH	7.74 (s), 7.04 (s)
24	甲酸盐	CH	8.45 (s)

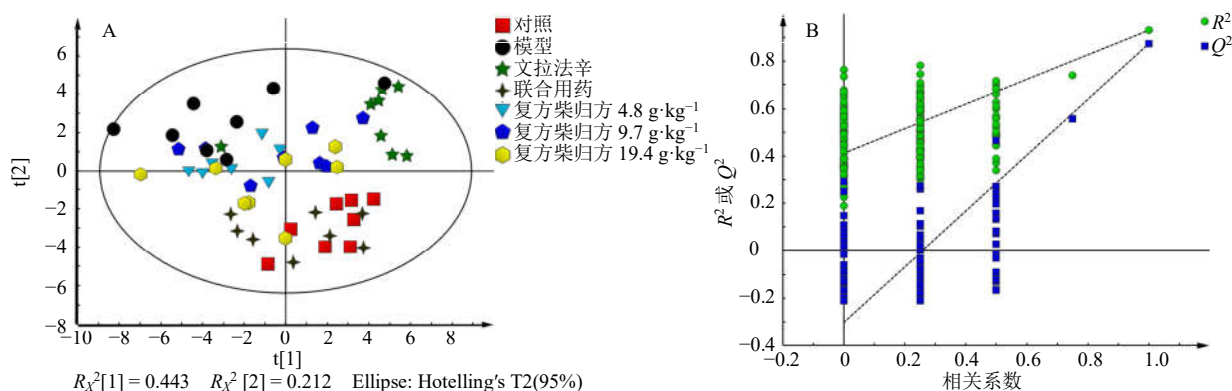


图 2 大鼠血清样本 PLS-DA 散点图 (A) 和相应的模型验证图 (B)

Fig. 2 PLS-DA (A) and corresponding validation plot (B) derived from $^1\text{H-NMR}$ spectra of serum from all rats

3.3 血清差异代谢物的筛选

为进一步确定建模前后大鼠血清内源性代谢物的差异, 从代谢物角度研究复方柴归方的抗抑郁作用机制, 采用 OPLS-DA 方法对模型组与对照组进行分析, 得到 OPLS-DA 得分图 (图 3-A) 和 S-plot 图 (图 3-B), 通过 S-plot 图结合 VIP 值 (>1), 独立样本 t 检验 $P < 0.05$ 寻找差异代谢物, 从而得到 6 个峰面积具有显著性差异的内源性代谢产物, 其结

果见图 4。

模型组与对照组 OPLS-DA 分析结果 (图 3-A) 表明, 对照组与模型组明显分开, 模型建立成功。由图 4 可知, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中含量显著升高 ($P < 0.05, 0.01$) 的有 *N*-乙酰糖蛋白、葡萄糖、胆碱, 含量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$) 的有异亮氨酸、肌酸、氧化三甲胺。复方柴归方各剂量组、阳性药组以及联合用药组均能有效调节这 6

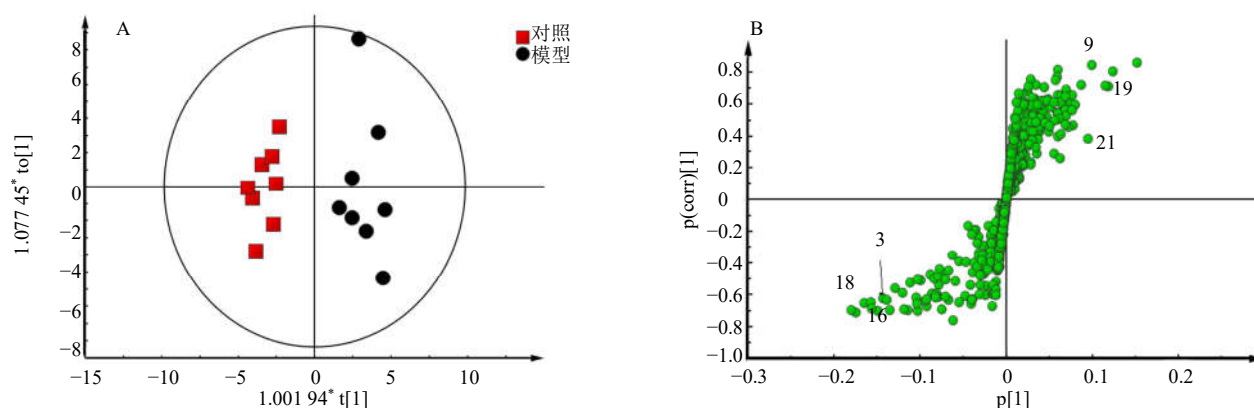
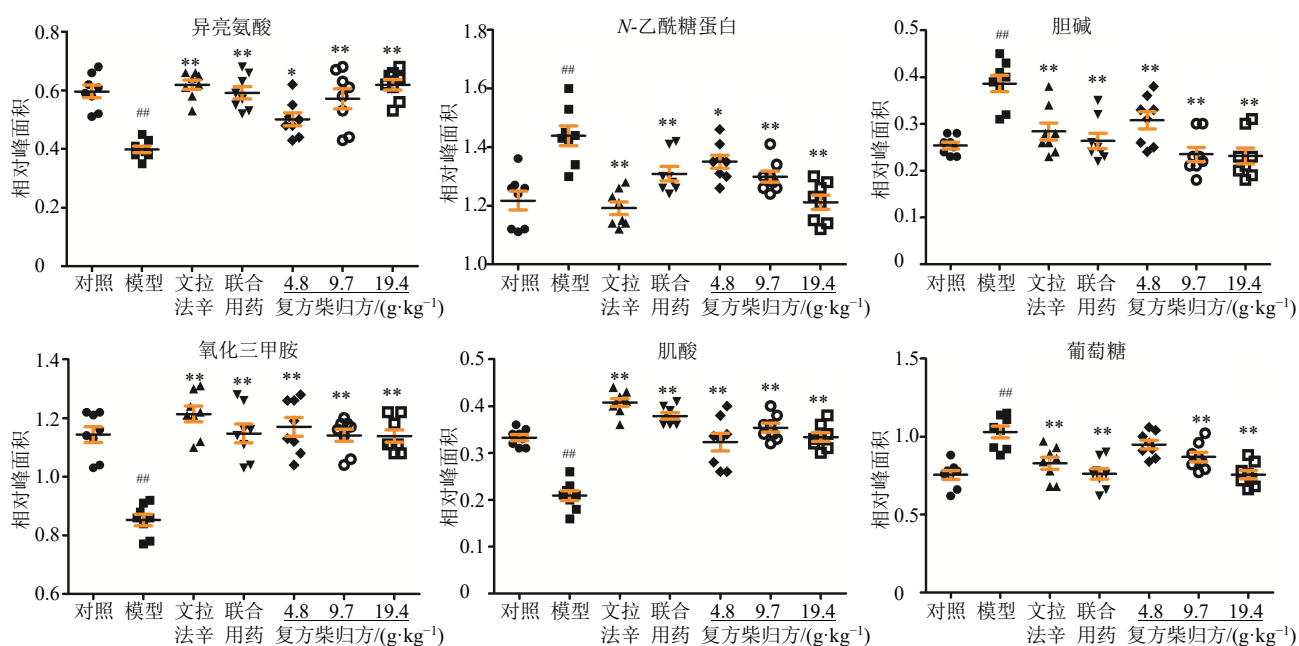


图 3 对照组与模型组大鼠血清样本 OPLS-DA 散点图 (A) 和相对应的 S-plot 图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA scatters plot (A) and corresponding S-plot (B) of serum of rats in control and model groups



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 4 大鼠血清中差异代谢产物相对峰面积

Fig. 4 Relative peak areas of endogenous metabolites with difference in serum of rats

种代谢物接近对照组水平, 其中联合用药组和复方柴归方中、高剂量组的差异代谢物水平与对照组最为接近。

4 讨论

代谢组学整体性的优势可以对样本中各种各样的内源性代谢物进行评价, 全面反映机体的代谢物变化情况。代谢组研究表明, 抑郁症的诱发可能与氨基酸代谢、能量代谢、肠道微生物、神经生化等多种代谢途径有关^[13]。

与对照组相比, CUMS 模型大鼠血清中异亮氨

酸含量显著降低。有研究表明异亮氨酸有助于星形胶质细胞的形成, 能维持脑内氮原子的平衡, 而脑内氮失衡可导致中枢神经系统功能障碍^[14]; 异亮氨酸在谷氨酸的合成过程中起着重要作用, 谷氨酸是一种兴奋性神经递质, 其诱导的神经毒性牵涉到抑郁症神经生物学^[15], 谷氨酸水平的变化也与抑郁症的发病紧密相关^[13-16]; 异亮氨酸可增加脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达量, 其能减轻神经元细胞退化和增加神经元细胞的数量, 主导抑郁症相关的信号通路^[17]。在本研究中, CUMS 模型大鼠血清

异亮氨酸含量降低,表明大鼠神经系统代谢紊乱,复方柴归方各剂量组均能回调异亮氨酸水平,表明复方柴归方各剂量组可以通过回调异亮氨酸水平来发挥抗抑郁作用。

CUMS 抑郁模型大鼠血清中葡萄糖水平显著升高。Eaton 等^[18]对 1 715 例抑郁症患者随访 13 年,发现重度抑郁症可增加发生 2 型糖尿病的患病几率,而抑郁情绪能影响体内糖代谢,使机体对糖代谢的调节能力降低;葡萄糖是人体内能量代谢的主要来源,有研究表明抑郁症患者体内能量代谢紊乱^[19-20];CUMS 模型大鼠体内葡萄糖水平升高,表明其机体糖代谢失衡,能量利用率降低,给予复方柴归方后,葡萄糖水平降低,表明复方柴归方各剂量组可通过回调葡萄糖水平来发挥抗抑郁作用。

胆碱是膜磷脂的重要组成部分,对保持细胞的完整性起到了重要作用,抑郁模型大鼠胆碱含量增加表明抑郁症使膜磷脂的组成发生了变化^[13];胆碱也是合成不饱和溶血磷脂酰胆碱的前体,有研究表明,CUMS 模型大鼠中不饱和溶血磷脂酰胆碱水平升高,表明氧化效应增强,而氧化效应是抑郁症的典型特征^[21];而胆碱可用于中枢神经递质乙酰胆碱的合成,抑郁症患者体内胆碱代谢紊乱^[22],因此机体胆碱代谢异常与抑郁症有着密切关系,CUMS 大鼠血清中胆碱含量升高,表明该模型大鼠伴有神经递质代谢失衡。

氧化三甲胺是肠道微生物特有的生物标志物。胆碱可在肠道内被微生物降解为三甲胺,随后进入肝脏转化为氧化三甲胺。有研究表明,脑和肠道存在双向交流,抑郁情绪可能通过影响肠道微生物来激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)^[23],且肠道菌群还可影响 BDNF 的水平^[24]。CUMS 模型大鼠体内氧化三甲胺含量改变,表明该模型肠道微生物代谢异常,复方柴归方可能通过调节肠道菌群代谢来发挥抗抑郁作用。

与对照组相比,CUMS 模型大鼠血清中 *N*-乙酰糖蛋白含量明显升高,肌酸含量显著下降,有研究表明,在抑郁症患者体内 *N*-乙酰糖蛋白水平显著升高,故其可作为临床上抑郁症诊断的特征性生物标志物^[25];肌酸-磷酸肌酸系统在细胞能量转移中起到了关键作用,肌酸是肌酸酐的前体,肌酸酐水平降低可引起机体疲劳,而能量缺失和疲劳是抑郁症最具代表性的症状^[15,26]。CUMS 模型大鼠给予复方柴归方后,*N*-乙酰糖蛋白和肌酸含量均出现回调,说

明复方柴归方可通过回调这 2 种代谢物来发挥抗抑郁作用。

综上所述,通过基于 NMR 的代谢组学技术对 CUMS 模型大鼠血清中的内源性代谢物进行全面分析,得到了 6 个抑郁症疾病生物标志物和复方柴归方疗效标志物,为复方柴归方抗抑郁作用机制研究提供了科学依据。复方柴归方可能是通过调节机体糖代谢、氨基酸代谢、肠道微生物等代谢途径,使机体的能量代谢增加,神经递质水平升高,肠道菌群活动正常,从而发挥抗抑郁作用。

参考文献

- [1] 何振宏,张丹丹,罗跃嘉. 抑郁症人群的心境一致性认知偏向 [J]. 心理科学进展, 2015, 23(12): 2118-2128.
- [2] Thwala J D, Sherwood P M, Edwards S D. Description of phonophenetics counselling as expressive therapeutic modality for treating depression [J]. *Art Society*, 2018(3): 1-6.
- [3] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [4] 陈佳佳,李爱平,张晓琴,等. 基于核磁共振代谢组学的成分数据分析在中药评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3522-3526.
- [5] 李媛,张雯霞,何盼,等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的还贝止咳方对咳嗽变异性哮喘豚鼠的干预作用 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2230-2239.
- [6] 赵珊,王鹏程,冯健,等. 代谢组学技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 756-765.
- [7] Zhang P J, Li Y M, Zhang Y N, et al. Application and prospect of toxicity quality markers of traditional Chinese medicine based on metabolomics [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(2): 108-115.
- [8] Mao Q, Xu J D, Kong M, et al. LC-MS-based metabolomics in traditional Chinese medicines research: Personal experiences [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 14-21.
- [9] 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.
- [10] 张涛,赵芳,张潇,等. 复方柴归方抗抑郁作用及其调控 5-羟色胺代谢途径机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1338-1344.
- [11] Banerjee P, Dutta M, Srivastava S, et al. ¹H-NMR serum metabonomics for understanding metabolic dysregulation in women with idiopathic recurrent spontaneous

- miscarriage during implantation window [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(6): 3100-3106.
- [12] Diao C, Zhao L, Guan M, *et al.* Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a ¹H-NMR based metabonomic approach [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(3): 686-693.
- [13] 李金兵, 李翼鹏, 田俊生, 等. 基于慢性温和不可预知应激模型内源性代谢物变化探讨抑郁症病理机制 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 108-115.
- [14] Shimomura Y, Harris R A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: Discussion of session 1 [J]. *J Nutr*, 2006, doi: 10.1093/jn/136.1.232S.
- [15] Zheng S, Zhang S, Yu M, *et al.* An ¹H-NMR and UPLC-MS-based plasma metabonomic study to investigate the biochemical changes in chronic unpredictable mild stress model of depression [J]. *Metabolomics*, 2011, 7(3): 413-423.
- [16] 王伟明, 黄育华, 熊振芳, 等. 肝气郁结证大鼠尿液代谢组学研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(2): 102-105.
- [17] Furukawahibi Y, Nitta A, Ikeda T, *et al.* The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 220(2): 271-280.
- [18] Eaton W W, Armenian H, Gallo J, *et al.* Depression and risk for onset of type II diabetes: A prospective population-based study [J]. *Diabetes Care*, 1996, 19(10): 1097-1102.
- [19] 李则犖, 张晨, 方贻儒. 线粒体功能异常假说在抑郁症中的研究进展 [J]. 中华精神科杂志, 2012, 45(3): 181-184.
- [20] Cao X, Li L P, Wang Q, *et al.* Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 773-777.
- [21] Maes M, Delange J, Ranjan R, *et al.* Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: Modulation by psychotropic drugs [J]. *Psych Res*, 1997, 66(1): 1-11.
- [22] 王冬青, 朱彦, 李月峰, 等. 首发抑郁症患者敏感脑结构的磁共振质子波谱分析 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(1): 19-21.
- [23] Dinan T G, Cryan J F. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, 37(9): 1369-1378.
- [24] Bercik P, Denou E, Collins J, *et al.* The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(2): 599-609.
- [25] 夏小涛, 孙宁, 刘彩春, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的抑郁症生物标志物发现及帕罗西汀干预作用 [J]. 药学报, 2016, 51(4): 595-599.
- [26] Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans [J]. *Acta Physiol*, 1998, 162(3): 261-266.