

· 药理与临床 ·

GC-MS 代谢组学分析逍遥散干预抑郁模型大鼠盲肠代谢物组的变化规律

田俊生¹, 左亚妹^{1,2}, 孙海峰¹, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 太原天中益耀科技有限公司, 山西 太原 030006

摘要: 目的 采用 GC-MS 代谢组学方法分析逍遥散干预抑郁模型大鼠盲肠组织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, 以逍遥散及盐酸氟西汀 (氟西汀) 为干预药物, 采用 GC-MS 方法分析大鼠盲肠组织代谢物组及其变化规律。化合物的结构通过 NIST 05 数据库检索及对照品指认确定, 将数据预处理后导入 SIMCA-P 13.0 软件进行多元统计分析。结果 CUMS 抑郁大鼠模型复制成功, 代谢组学研究结果表明氟西汀及逍遥散干预后大鼠盲肠组织中丙氨酸、丝氨酸、谷氨酸等减少, 氟西汀组棕榈酸、硬脂酸升高, 且与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 逍遥散干预后 CUMS 大鼠盲肠组织的代谢物组发生明显变化, 该研究可为逍遥散抗抑郁作用机制研究提供依据。

关键词: 逍遥散; GC-MS; 代谢组学; 盲肠组织; 慢性温和不可预知应激; 抑郁

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)13-1931-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.013

Analysis on endogenous metabolites in cecal tissue of CUMS-induced depression rats after Xiaoyao San intervention by GC-MS metabolomics

TIAN Jun-sheng¹, ZUO Ya-mei^{1,2}, SUN Hai-feng¹, QIN Xue-mei¹

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

2. Taiyuan Tian-Zhong-Yi-Yao Science and Technology Co., Ltd., Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To investigate the changes of endogenous metabolites in cecal tissue of CUMS-induced depression rat model interfered by Xiaoyao San via GC-MS metabolomics. **Methods** Chronic unpredictable mild stress (CUMS) rat model was used and Xiaoyao San and fluoxetine hydrochloride (fluoxetine) treatment were intervention drug. The endogenous metabolites were analyzed and identified by NIST 05 database or authentic standards. The final data were introduced into SIMCA-P 13.0 software package for multivariate analysis. **Results** The CUMS rat model was successfully duplicated, the metabolites of alanine, serine, and glutamic acid were reduced at fluoxetine group and Xiaoyao San group, and palmitic acid and stearic acid were increased in fluoxetine group in cecal tissue of rats after drug intervention, compared with model group with significant difference ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion** The endogenous metabolites were changed by Xiaoyao San intervention significantly in cecal tissue of CUMS rats, which provides a basis for further study of the mechanism of Xiaoyao San treatment of depression.

Key words: Xiaoyao San; GC-MS; metabolomic; cecal tissue; chronic unpredictable mild stress; depression

抑郁症是一种常见的心境障碍, 其核心症状为情绪低落、思维迟缓、意志活动减退, 更有甚者出现睡眠障碍、自杀倾向等现象^[1-4]。心理学者认为, 胃肠道症状是抑郁症的一种躯体化表现, 即抑郁可能通过中枢神经系统与肠神经系统之间相互作用等多途径影响肠道运动、分泌、内脏感受等功能^[5]。

大量研究证实, 应激、焦虑和抑郁与肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 密切相关, 抗抑郁药物在治疗 IBS 中的作用已引起广泛关注^[6]。本实验室前期对逍遥散干预慢性温和不可预知应激 (CUMS) 抑郁模型大鼠的盲肠菌群进行了大量研究, 表明盲肠是抑郁症发生过程中的重要防御器官, 具有扶植

收稿日期: 2014-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173366, 81102833, 81441096); 山西省基础研究项目 (2012021031-2); 山西省普通高校重点学科建设项目; 山西省科技创新重点团队 (2013131015)

作者简介: 田俊生 (1980—), 男, 内蒙古人, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理与新药研发。Tel: (0351)7019297 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

*通信作者 秦雪梅, 博士, 教授, 研究方向为中医药代谢组学。Tel: (0351)7011501 Fax: (0351)7018397 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

正常菌群生长和调整菌群失调的作用^[7], 为此本实验进一步研究盲肠组织化学成分的变化, 探究抑郁症与盲肠组织的关系。

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》, 由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷和甘草共 8 味药组成, 是疏肝解郁、调和肝脾的代表方剂, 临床及实验研究均显示该方有确切的抗抑郁作用^[8-10]。代谢组学是近年来生命科学领域研究的一大热点, 它通过研究生物体对环境等因素产生的代谢物的质和量的动态变化, 从整体角度评价生物体代谢状态的波动, 从而更深刻地理解生命过程^[11]。

GC-MS 具有灵敏度高、分离效率高、分析时间短和同时提供样品的相对分子质量与结构信息等优点^[12]。本研究采用 GC-MS 方法和代谢组学技术从代谢物组的角度分析逍遥散干预 CUMS 抑郁大鼠盲肠组织化学成分的变化, 为抑郁症发病机制及逍遥散抗抑郁的作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

成年雄性 SD 大鼠, 体质量 (180±20) g, 24 只, 购自中国食品药品检定研究院实验动物中心, 许可证编号 SCXK (京) 2011-0008。置于昼夜节律光照下, 自由禁食禁水 3 d, 采用旷场实验对大鼠行为学评分, 并称体质量。

1.2 药品与试剂

中药材饮片: 北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、生姜和薄荷, 购自山西华阳药业有限公司, 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。盐酸氟西汀 (氟西汀, Eli Lilly & Company Limited, 英国, 批号 A342299, 购自山西黄河大药房); *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷) 三氟乙酰胺 (MSTFA)、1%三甲基氯硅烷 (TMCS) (Sigma-Aldrich 公司, 美国); 二十四烷 (上海索莱宝生物有限公司); 吡啶、甲氧胺盐酸盐、正庚烷、甲醇、氯仿、甲苯 (分析纯, 北京化工试剂公司); 丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、葡萄糖 (中国食品药品检定研究院)。

1.3 仪器

代谢笼 (苏州实验动物笼具厂); YSD-4 药理学实验多用仪 (蚌埠医学院无线电二厂); LD500-1 电子天平 (沈阳龙腾电子有限公司); 101 系列恒温干燥箱 (北京和同创业科技有限责任公司); KQ2200DB 型数控超声仪 (昆山超声仪器有

限公司); Trace GC-PolarisQ MS 气相色谱-质谱联用仪 (Thermo Finnigan 公司, 美国); TGL-16 高速台式冷冻离心机 (湘仪离心机有限公司)。

2 方法

2.1 溶液的配制

逍遥散按照处方量配比 (北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜质量比 6:6:6:6:6:3:2:2) 称取药材适量, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 2 h, 水煎提取 2 h, 收集水煎液, 再用 8 倍体积水提取 2 次, 每次 1 h。合并 3 次水煎液, 减压浓缩至稠浸膏 [含藁本内酯 (40.25±0.94) mg/g、白术内酯 I (1.96±0.85) mg/g, 白术内酯 II (6.22±2.11) mg/g], 干燥, 磨成干粉, 4 °C 保存, 用时新配。

二十四烷-正庚烷溶液: 精密称取二十四烷 100 mg 置于 100 mL 量瓶中, 正庚烷稀释至刻度; 精密移取上述溶液 10 mL 置于 100 mL 量瓶中, 正庚烷稀释至刻度, 即得质量浓度为 0.1 mg/mL 的内标溶液。

盐酸甲氧胺-吡啶溶液: 精密称取盐酸甲氧胺适量, 用吡啶稀释至质量浓度为 15 mg/mL, 即得。

2.2 分组与给药

依据行为学评分和体质量, 将大鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、氟西汀 (6 mg/kg) 组和逍遥散 (生药 46.2 g/kg^[13]) 组。给药组均 ig 给药, 给药体积均为 10 mL/kg, 对照组和模型组大鼠 ig 给予等量生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 28 d, 造模同时给药。

2.3 CUMS 抑郁模型复制

按照 Li 等^[14]的方法复制 CUMS 抑郁模型。10 种刺激因子随机安排: (1) 潮湿垫料、45° 倾斜; (2) 禁食 24 h; (3) 禁水 24 h; (4) 50 °C 环境 5 min; (5) 夹尾 1 min; (6) 4 °C 冰水游泳 5 min; (7) 电击, 电压 50 mV, 每隔 30 s 刺激 1 次, 每次 10 s, 共 15 次; (8) 束缚 4 h; (9) 接触陌生生物体 (如塑料杯、木勺等); (10) 噪音 (60 Hz) 1 h。每天给予 1 种刺激, 同种刺激不连续出现, 造模 21 d, 恢复 7 d。对照组大鼠群养, 不给予刺激; 其他各组大鼠单笼饲养, 并给予刺激。饲养条件: 温度 (24±1) °C, 湿度 30%~60%, 昼夜节律 12 h/12 h, 标准实验室饲料喂养, 自由饮水。

2.4 样品的采集与处理

实验第 29 天, 称大鼠体质量, ip 20%乌拉坦 (1.5 g/kg) 麻醉, 解剖盲肠, 低温生理盐水洗涤, 称质量, 再用无 RNase 水冲洗至肉眼看不见残留物, 液

氮速冻, -80 °C 保存。

2.5 GC-MS 代谢组学数据采集

2.5.1 样品制备 精密称取盲肠组织样品 20 mg, 加入 280 μL 氯仿-甲醇-水溶液 (8:5:15), 冰浴超声 10 min; 1.0×10⁴ r/min 离心 3 min, 移取上清液 120 μL, 30 °C 真空干燥 12 h; 加入 12 μL 盐酸甲氧胺-吡啶溶液, 70 °C 反应 1 h, 再加入 20 μL MSTFA (含 1% TMCS), 40 °C 孵育 90 min, 最后加入 200 μL 二十四烷-正庚烷内标溶液, 涡旋。

2.5.2 GC-MS 条件 色谱条件: DB-5MS 毛细管柱 (5% 苯基-95% 聚二甲基硅氧烷交联, 30 m×250 μm, 0.25 μm; Agilent J&W Scientific, Folsom, 美国); 进样口温度 260 °C, 无分流模式进样, 进样量 1 μL, 起始温度 60 °C, 保持 3 min, 以 7 °C/min 升至 140 °C, 保持 4 min, 以 5 °C/min 升至 180 °C, 保持 6 min, 再以 5 °C/min 升至 280 °C, 保持 2 min。质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 200 °C, 电子能量 70 eV, 扫描范围 *m/z* 50~650。

2.6 多元统计分析

使用 XCMS 软件 (<http://metlin.scripps.edu/download>) 对 GC-MS 图谱预处理后, 将数据导入 Excel 中进行归一化, 导入 SIMCA-P 13.0 进行主成

分分析, 采用 NIST 05 质谱库检索、对照品比对、文献参考、HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>) 比对等方法对生物标志物进行结构指认。

3 结果

3.1 各组大鼠盲肠总离子流色谱图

对照组、模型组与给药组大鼠盲肠组织 GC-MS 总离子流色谱图见图 1。由图 1 可知, 总离子流色谱图基本相似, 色谱峰保留时间 (*t_R*) 主要集中在 5~45 min, 但也有一定区别, 如 *t_R* 为 5~7 min 的 2 个主要峰在模型组中的峰高明显低于对照组; *t_R* 为 37~38 min 的峰在模型组中峰高也比较低; *t_R* 为 6.35 min 的峰在氟西汀组中的峰高明显高于逍遥散组; *t_R* 为 37 和 41 min 左右的 2 个峰在逍遥散组中也较低。各色谱峰具体指认结果见表 1。

3.2 主成分分析结果

采用 PCA 方法对所有样本的 GC-MS 数据进行分析, 结果见图 2。可知, 对照组和模型组沿 *t*[1] 轴分开, 表明 CUMS 模型复制成功。给药组与对照组、模型组距离均较远, 说明药物在代谢过程中对盲肠组织化学成分的影响比较显著。

为了找出发生显著变化 (*P*<0.05) 的生物标志物, 对模型组与对照组及模型组与各给药组进行

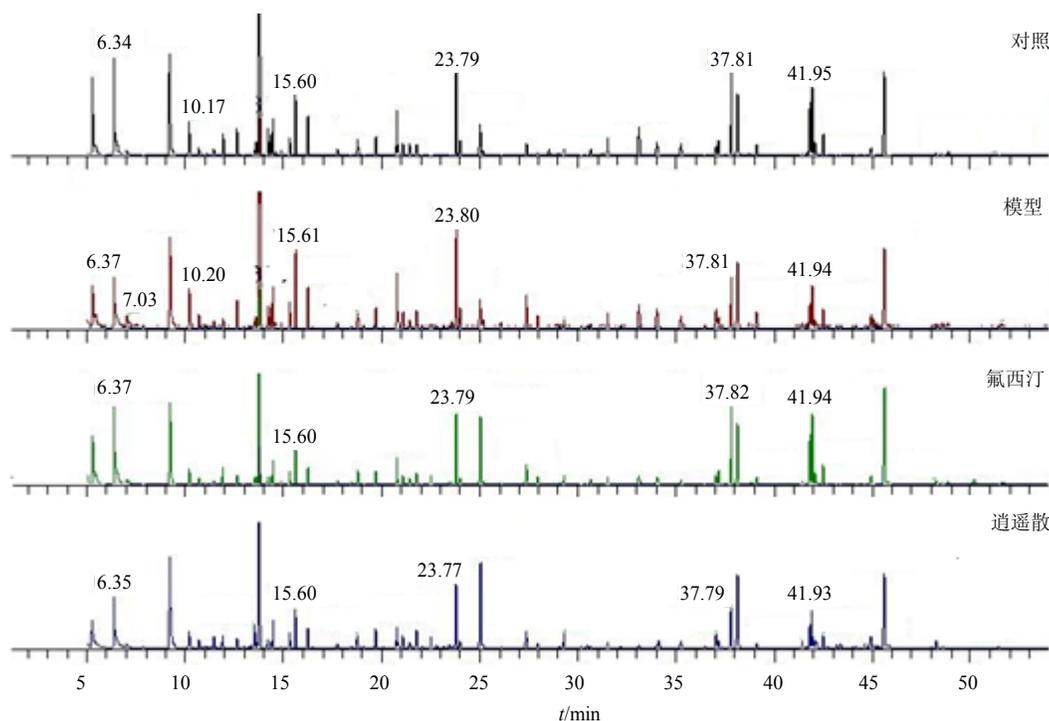


图 1 对照组、模型组、逍遥散组、氟西汀组大鼠盲肠组织 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of cecal tissue of rats in control, model, fluoxetine, and Xiaoyao San groups

表 1 指认的大鼠盲肠组织化学成分

Table 1 Endogenous metabolites of cecal tissue in rats

t_R/min	生物标志物	m/z	t_R/min	生物标志物	m/z
9.21	乳酸	73.06	25.04	核糖	225.15
10.19	丙氨酸	116.18	27.36	乌头酸	315.21
12.64	缬氨酸	144.36	27.94	对羟基苯丙酸	156.20
13.73	甘油	147.18	29.29	异柠檬酸	265.25
13.78	磷酸	299.21	30.60	果糖	217.39
14.27	异亮氨酸	158.15	31.14	半乳糖	129.27
14.45	甘氨酸	174.39	31.52	葡萄糖	319.31
14.83	丁二酸	147.29	33.11	2-吡啶甲酸	156.25
15.61	丝氨酸	204.27	34.01	酪氨酸	218.24
16.30	苏氨酸	101.19	37.80	棕榈酸	313.35
19.73	苹果酸	147.31	38.13	肌醇	217.27
20.76	天冬氨酸	232.23	41.68	色氨酸	202.40
21.10	谷氨酰胺	156.35	41.81	亚油酸	337.35
23.79	谷氨酸	246.26	41.95	硬脂酸	341.36

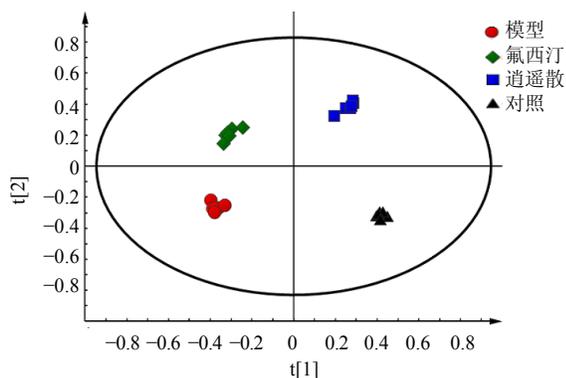


图 2 大鼠盲肠组织 GC-MS 谱 PCA 分析散点图

Fig. 2 GC-MS spectrum PCA scores plots of cecal tissue of rats

OPLS-DA分析,并得到代谢物载荷图,结果见图3~5。由图3可知,对照组和模型组能够很好地分开,说明两组之间盲肠组织的化学成分发生明显改变。由图4可知,逍遥散组与模型组明显分开;由图5可知,氟西汀组和模型组明显分开,说明盲肠组织的代谢物发生改变。

依据载荷图中,离原点最远的点对分组贡献最大的原则,同时采用 SPSS 18.0 软件对位于载荷图中边缘位置代谢物的峰面积进行独立样本 t 检验,峰面积具有显著性差异的潜在生物标志物结果见表 2。在造模过程中,大鼠被给予各种刺激,使其处于抑郁状态,对盲肠组织造成影响。通过寻找有明显差

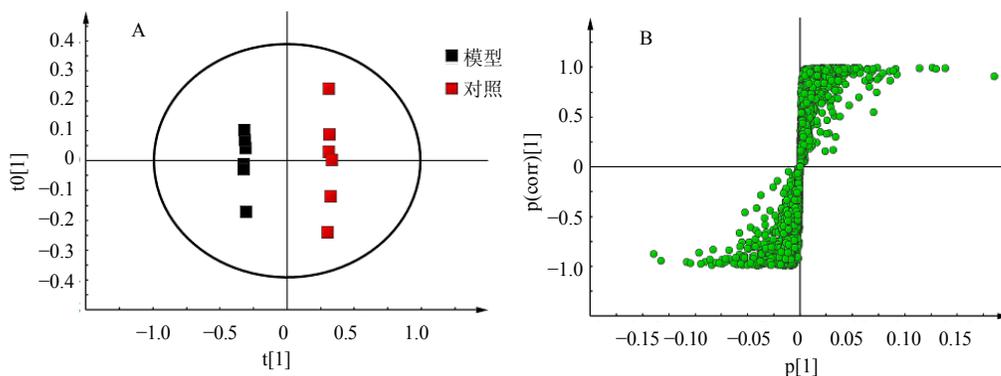


图 3 对照组和模型组大鼠盲肠组织的 OPLS-DA 图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA scores plot (A) and loading S-plot (B) of cecal tissue of rats in control and model groups

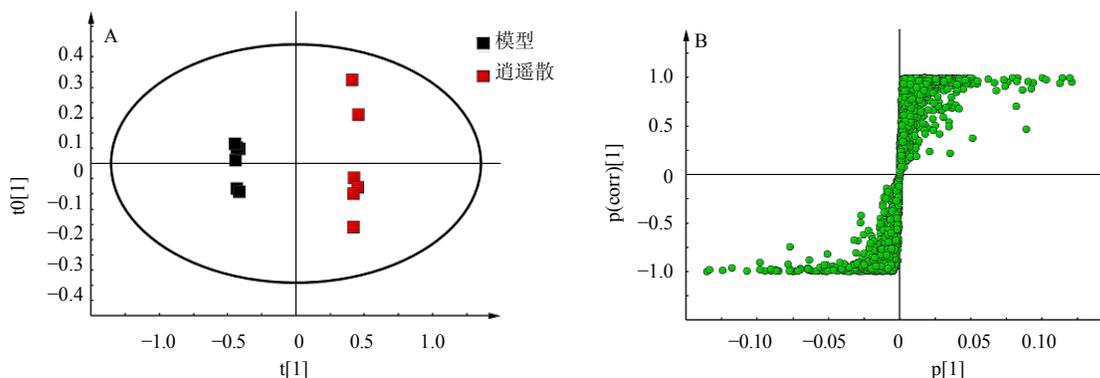


图4 逍遥散组和模型组大鼠盲肠组织的 OPLS-DA 图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 4 OPLS-DA scores plot (A) and loading S-plot (B) of cecal tissue of rats in Xiaoyao San and model groups

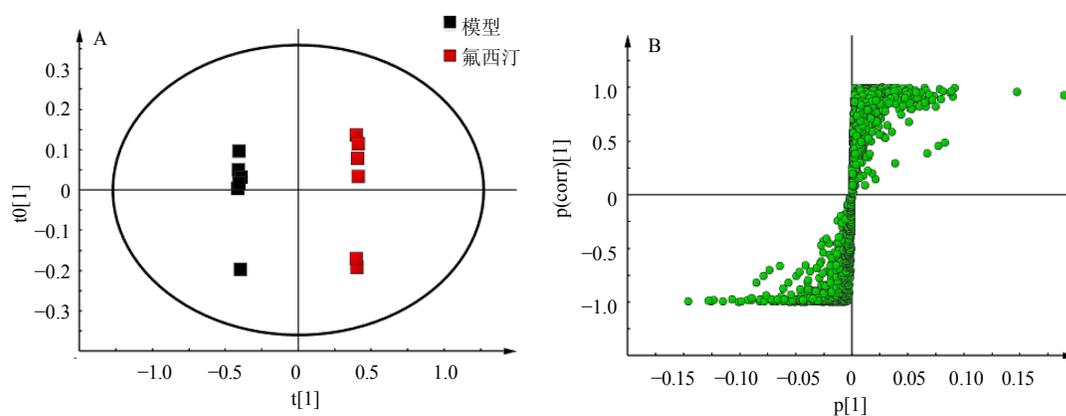


图5 氟西汀组和模型组的 OPLS-DA 图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 5 OPLS-DA scores plot (A) and loading S-plot (B) of cecal tissue of rats in fluoxetine hydrochloride and model groups

表2 特征代谢物组相对峰面积比较

Table 2 Comparison on typical compounds based on mean peak areas after internal standard normalization

组别	相对峰面积				
	丙氨酸	丝氨酸	谷氨酸	棕榈酸	硬脂酸
对照	0.017 0±0.001 0	0.025 0±0.000 5	0.044 0±0.003 0	0.050 0±0.000 5	0.038 0±0.003 0
模型	0.020 0±0.000 5 ^{###}	0.032 0±0.000 5 ^{###}	0.057 0±0.000 5 ^{###}	0.031 0±0.000 5 ^{###}	0.023 0±0.000 5 ^{##}
逍遥散	0.014 0±0.000 5 ^{**}	0.019 0±0.001 0 ^{**}	0.040 0±0.000 5 ^{**}	0.028 0±0.000 5 ^{**}	0.022 0±0.002 0
氟西汀	0.010 0±0.001 0 ^{**}	0.014 0±0.000 5 ^{**}	0.036 0±0.002 0 ^{**}	0.059 0±0.001 0 ^{**}	0.046 0±0.001 0 ^{**}

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

^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

异的化学成分, 即生物标志物, 能够说明逍遥散对盲肠组织化学成分的影响主要表现在丙氨酸、丝氨酸、棕榈酸、谷氨酸、硬脂酸的变化。

4 讨论

现代药理学研究表明, 抑郁症的诱发可能与单胺类神经递质去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)等不足有关^[15]。李熠萌等^[16]研究表明, 逍遥散对心理社会因素所致的应激性机体功能失调具有较好

的调节作用, 能改善慢性应激大鼠的行为学变化, 对代谢终产物有明显的调节效应。石君杰等^[17]研究发现逍遥散能降低结肠黏膜 5-HT 的表达, 推测逍遥散的作用机制可能是通过调节模型大鼠 5-HT 信号系统, 减弱脊髓背角神经元兴奋性, 从而提高内脏痛阈, 消除肠道的过敏反应。

代谢组学的研究方法 with 中医治疗疾病的整体观念是相一致的, 对认识中药的药效作用, 在治疗中

的正确用药都有重要意义,也为疾病的研究开拓了全新的方法^[18-19]。因此,应用代谢组学技术评价传统中药复方的药理活性具有先进性和合理性。研究表明代谢组学技术的多元统计分析(PCA、PLS-DA、OPLS-DA)指标灵敏性较传统方法明显提高^[20],许多动物行为学、形态学,甚至有限的生化指标不能显示差异时,通过代谢组学方法不仅可以有效分类,而且可寻找到与分类有关的一组特征性标志物。

本研究从组织化学成分的角度采用GC-MS方法比较了CUMS抑郁模型及药物干预后大鼠盲肠组织化学成分的变化,发现CUMS能够引起大鼠盲肠组织化学成分的显著改变。采用盲肠组织样本作为研究对象,能够直接反映细胞的代谢轮廓。CUMS抑郁模型大鼠的盲肠组织中含有各类小分子代谢物,包括氨基酸、脂肪酸、有机酸、糖类等,且部分在量上与对照组有明显差异,这些物质参与了多种生理生化过程,特别是细胞的能量代谢和脂质代谢^[21]。其中,与对照组相比,模型组大鼠盲肠组织中的棕榈酸、硬脂酸的量显著降低,而棕榈酸、硬脂酸是机体提供能量的主要来源,提示CUMS抑郁模型大鼠盲肠组织的能量代谢加强。

药物干预对CUMS大鼠盲肠组织的化学成分存在较大影响。其中,棕榈酸、硬脂酸的变化趋势与CUMS所引起的变化趋势并不相同,是否由于药物在体内代谢过程中与盲肠组织有直接接触,造成其所产生的影响比CUMS产生的间接影响更为显著,均需要进一步深入探索。

参考文献

- [1] 郭雨欣,邢国刚. 抑郁症的生物学机制研究进展 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(1): 57-60.
- [2] 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.
- [3] 薛水玉,郑兴宇,窦春艳,等. 文拉法辛和氟西汀抗抑郁作用机制和药效特点的代谢组学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 29-33.
- [4] 郑兴宇,高晓霞,刘晓节,等. 基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 175-179.
- [5] O'Malley D, Julio-Pieper M, Gibney S M, et al. Distinct alterations in colonic morphology and physiology in two rat models of enhanced stress-induced anxiety and depression-like behaviour [J]. *Stress*, 2010, 13(2): 114-122.
- [6] 杨金选,曹德勇. 抗抑郁药物对肠易激综合征患者治疗效果与肠道敏感性的影响 [J]. 成都医学院学报, 2012, 7(2): 243-244.
- [7] 刘伟. 逍遥散干预慢性温和性不可预知应激大鼠盲肠菌群及组织研究 [D]. 太原: 山西大学, 2011.
- [8] 阎兆君,彭伟. 难病奇方系列丛书——逍遥散 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005.
- [9] 杨杰,黄丹雪,鹿秀梅,等. 小柴胡汤化学成分及其在抑郁模型大鼠体内代谢成分的分析 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1691-1698.
- [10] 吴红彦,王虎平. 逍遥散及其拆方对老年性痴呆模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 102-104.
- [11] Hatzinger M. Neuropeptides and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system: review of recent research strategies in depression [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2000(1): 105-110.
- [12] 孙皓,刘薇,曾建国,等. GC-MS分析不同产地香荚兰商品荚乙醇提取物化学成分差异及其香草醛的测定 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 955-959.
- [13] 崔杰,郑兴宇,高晓霞,等. 逍遥散抗抑郁作用最佳剂量筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 194-198.
- [14] Li Z Y, Zheng X Y, Gao X X, et al. Study of plasma metabolic profiling and biomarkers of chronic unpredictable mild stress rats based on gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 3539-3546.
- [15] 黄佩珊. 柴胡疏肝散联合抗抑郁药物治疗抑郁障碍的研究进展 [J]. 中医学报, 2012, 27(168): 627-629.
- [16] 李熠萌,蔡淦. 腹泻型肠易激综合征的中医实验研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 541-544.
- [17] 石君杰,王海云,宋李亚,等. 逍遥散对肠易激综合征大鼠5-羟色胺及5-羟色胺转运体作用研究 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(7): 490-491.
- [18] Rochfort S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(12): 1813-1820.
- [19] 谷金宁,牛俊,皮子凤,等. 尿液代谢组学方法研究人参皂苷治疗糖尿病心肌病大鼠作用机制 [J]. 分析化学研究报告, 2013, 3(41): 371-376.
- [20] Par J, Hans S, Thomas M, et al. A strategy for modeling dynamic responses in metabolic samples characterized by GC/MS [J]. *Metabolomics*, 2006, 2(3): 135-143.
- [21] Liu P, Liu S L, Tian D Z, et al. The applications and obstacles of metabolomics in traditional Chinese medicine [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2012, 1155(10): 1-4.