

• 研究论文 •

基于¹H-NMR代谢组学技术寻找CCl₄致大鼠急性肝损伤的代谢标志物张艳花^{1,2}, 王东琴^{1,2}, 李晓伟^{1,2}, 张福生^{1*}, 李震宇¹, 薛英^{1,2}, 秦雪梅¹

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 采用核磁(¹H-NMR)代谢组学技术初步探讨四氯化碳(CCl₄)致大鼠急性肝损伤后血清代谢物变化规律。**方法** SD大鼠随机分为空白、模型两组,模型组ip 40% CCl₄植物油溶液造成急性肝损伤模型,空白组注射等体积的植物油,造模24 h后股动脉取血,常规肝脏病理切片,取血前12 h禁食不禁水。比色法测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量,600 MHz NMR波谱仪分析血清中小分子代谢物代谢轮廓,并对数据进行多元统计分析。**结果** 模型组中ALT的含量显著升高,肝脏病理切片显示模型组大鼠的肝组织内形成很多空泡,肝细胞变大,坏死严重,有出血和大量中性粒细胞浸润;血清¹H-NMR代谢图谱中共鉴定了20个代谢物,并确认了6个与CCl₄致肝损伤相关的标志物。**结论** 常规血生化指标和肝病理切片结果与代谢组学的多元统计分析结果相一致,且代谢组学可发现引起肝损伤的代谢标志物。

关键词: 四氯化碳; 肝损伤; NMR; 代谢组学; 丙氨酸氨基转移酶**中图分类号:** R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)01-0011-06**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.01.003Searching for biomarkers of CCl₄-induced acute liver injury in rats based on ¹H-NMR metabonomic approachZHANG Yan-hua^{1,2}, WANG Dong-qin^{1,2}, LI Xiao-wei^{1,2}, ZHANG Fu-sheng¹, LI Zhen-yu¹, XUE Ying^{1,2}, QIN Xue-mei¹

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

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective The nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) metabonomic technique is applied to study the change of serum metabolites in Sprague Dawley rats with CCl₄-induced acute liver injury. **Methods** The rats were randomly divided into control and model groups. The rats in the model group were ip injected with 40% CCl₄ solution of corn oil, while the rats in the control group were injected with the same amount of corn oil. The blood samples were collected from femoral artery after 24 h of CCl₄ treatment. The liver tissues were immediately removed and used for histopathological examination. The alanine aminotransferase (ALT) was determined using commercially available assay kits. The 600 MHz NMR spectrometer was used to analyze the metabolic profile of the small molecule metabolites in serum, and multivariate statistical analysis of the data was also conducted. **Results** The content of ALT in the model group was significantly increased. Histopathology of liver showed that there were many vacuoles and a large number of neutrophils infiltrating in the liver tissue of model group. The hepatic cells were necrotic and severely bleeding. Twenty metabolites were confirmed by NMR spectra, and six markers were affirmed to have associations with CCl₄-induced liver injury. **Conclusion** The results concluded by the multivariate statistical analysis of metabonomics are consistent with the conventional biochemical indicators and histopathology of liver. Furthermore, metabonomics could find markers which cause liver injury.

Key words: carbon tetrachloride; liver injury; NMR; metabonomics; alanine aminotransferase

肝脏是人体中重要的解毒器官,是许多药物、国内外所应用的急性肝损伤动物模型主要是生物
外源性化学物质、氧化性毒物的重要靶点。目前,性、免疫性、化学性等方法。化学方法中四氯化碳

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070295, 31100244)

作者简介: 张艳花(1987—),女,在读研究生,研究方向为中药质量控制研究。Tel/Fax: (0351)7019178 E-mail: yanhuazhangsxu@126.com

*通信作者 张福生 Tel/Fax: (0351)7019178 E-mail: ample1007@163.com

(CCl₄)、酒精及 *D*-氨基半乳糖胺 (*D*-GLaN) 是许多国内外学者倡导的肝损伤动物模型的诱导剂。而应用 CCl₄ 化学性肝损伤动物模型条件要求较低, 技术易于掌握, 可靠性强, 重复性好。基于以上原因, 本试验研究采用技术比较成熟的 CCl₄ 急性肝损伤动物模型。CCl₄ 致肝损伤的机制研究主要是 CCl₄ 进入机体后, 经肝脏细胞色素 P450 代谢, 生成三氯甲基自由基 ($\cdot\text{CCl}_3$) 和三氯甲基过氧自由基 ($\cdot\text{OOCCL}_3$), 这两种自由基引起肝细胞的各种变化导致肝损伤, 导致线粒体及内质网等细胞器功能紊乱和膜脂质过氧化等严重的机体损伤反应^[1]。现阶段主要通过试剂盒测定血清和肝脏中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 及细胞色素 P450 等含量的变化来推测肝损伤的可能发生过程, 但这样的方法存在备样方法繁琐、重复性差等局限性。而代谢组学的方法已经被应用到了肝损伤中酶代谢标志物的鉴定当中了。

代谢组学作为系统生物学中的一个重要分支, 它主要研究的是生物体液或组织中生物小分子在受到药物、环境、刺激干扰后的代谢变化^[2], 具有客观性、整体性。近年来依托高技术设备的发展, 代谢组学发展迅速, 已建立的技术平台有高分辨核磁共振 (NMR)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 等^[3]。NMR 技术是最早用于代谢组学的分析方法, 具有分辨率高、不破坏样品结构和性质且能对样品实现非选择性分析等优点^[4], 目前仍然是代谢组学研究的有力工具。本文采用 ¹H-NMR 代谢组学技术分析 CCl₄ 干扰后大鼠血清中代谢物的变化, 初步寻找 CCl₄ 致肝损伤的代谢标志物, 以期为肝损伤机制研究提供更多的方法依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

HH—2 数显恒温水浴锅 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); UV7501 紫外-可见分光光度计 (无锡科达仪器厂); Bruker 600-MHz Avance III 核磁仪 (德国 Brooke 公司)。CCl₄ (分析纯, 天津市登峰化学试剂厂, 批号 20110307); 金龙鱼食用调和油 (益海嘉里食品营销有限公司); ALT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20120603); D₂O (美国默克试剂公司, 批号 EB1655)。

1.2 动物及分组与造模

12 只成年雄性健康 SD 大鼠, 清洁级, 体质量 (200±20) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司生产, 动物许可证号 SCXK(京)2006-0008。在 (22~23) °C、(46±1) % 湿度条件下适应 1 周, 试验前动物自由进食, 维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。将大鼠随机分为空白组和模型组, 每组各 6 只。

模型组大鼠一次性 ip 40% CCl₄ 2 mL/kg (取 CCl₄ 溶液 40 mL, 用食用油稀释至 100 mL 即得), 造成大鼠的急性肝损伤模型, 空白组大鼠 ip 等体积的植物油。造模 24 h 股动脉取血于 10 mL Eppendorf (EP) 管内, 静置 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液得血清, 分装成每管 400 μL, 一部分按照试剂盒方法测定 ALT 含量, 一部分 -80 °C 保存待 NMR 分析。取血完毕后迅速取肝中叶固定于 10% 甲醛溶液中, 常规石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色剂 (HE) 染色, 光学显微镜观察。所有大鼠在取血前 12 h 均禁食不禁水。

1.3 NMR 代谢组学分析^[5]

冰水混合溶液解冻血清样品, 取血清 250 μL 于 EP 管中, 加入 350 μL D₂O, 4 °C, 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 500 μL 于内径 5 mm 的核磁管中。对上述血清样品进行 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列, CPMG 序列可以压制水峰和大分子物质的信号, 从而检测血清中的小分子代谢物。具体参数设置如下: 自旋弛豫延迟为 320 ms, 自由感应衰减为 64 k 数据点, 谱宽为 8 000 Hz, 扫描次数为 64 次。

1.4 NMR 图谱数据处理^[6]

采用 MestReNova 核磁图谱的专业处理软件 (version 6.1.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 对所有 NMR 图谱进行傅里叶转换并进行相位、基线调整。在 CPMG 图谱中, 以肌酐的化学位移 δ 3.04 为标准对图谱进行化学位移的校正。然后以 δ 0.04 为单位, 对 δ 0.4~6.0 区域的图谱进行等宽度分割, 同时将 δ 4.5~6.0 区域的谱峰强度设置为零, 以消除残留的水峰及尿素峰对分析结果的影响。然后对所得图谱进行分段积分, 即得到与化学位移值段相对应的积分值, 将数据保存在 Excel 文档。采用面积归一化法, 将数据归一化处理, 使数据集中在 0~1, 用于多变量统计分析。

1.5 统计学分析

运用 SIMCA-P 11.0 软件将积分数据进行中心化和规格化后进行模式识别分析。模式识别包括无

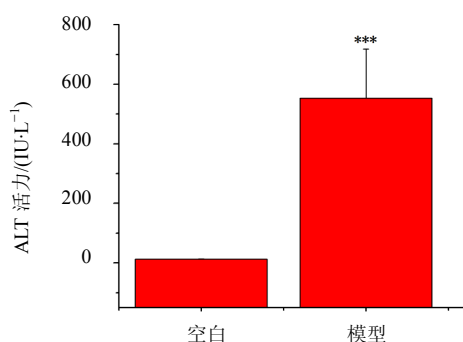
监督模式识别和有监督模式识别。首先进行无监督的主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA), PCA 主要应用于观察实验模型中的组间分离趋势以及是否有异常点的出现。为了找到与 CCl_4 急性肝损伤模型相关的潜在生物标志物, 进行有监督模式识别分析, 即在样品分类的基础上进行模式识别, 使各类样品间达到最大的分离, 并利用建立的模型对未知的样本进行预测。首先进行偏最小二乘法判别分析 (partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA), 然后进行正交偏最小方差判别分析 (orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA), 消除结构噪声, 使空白对照组和模型组的差别达到最大, 以便寻找到与 CCl_4 急性肝损伤模型相关的具有生物学意义的血清代谢物。以主成分矢量为坐标轴作图 (二维, scores 图), 可以反映类别间的差异。最后, 运用 OPLS-DA 数据的主成分 loading 图结合 VIP 值 ($\text{VIP} > 1$ 的代谢物是感兴趣的部分) 寻找潜在的生物标志物。

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS11.5 软件, 采用独立样本 t 检验进行统计分析。运用 OriginLab8.0 软件绘制统计图。

2 结果

2.1 生化指标结果

由试剂盒测试大鼠血清中 ALT 的含量, 结果见图 1, 模型组中 ALT 含量明显升高, 与空白组比较差异有显著性 ($P < 0.001$), 模型组是空白组的 43.6 倍, 说明造模成功。



与空白组比较: *** $P < 0.01$

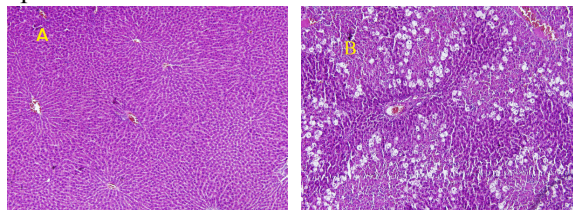
*** $P < 0.001$ vs control group

图 1 CCl_4 致急性肝损伤大鼠的血清中 ALT 水平 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 1 ALT level in serum of rats with CCl_4 -induced acute liver injury ($\bar{x} \pm s$)

2.2 急性肝损伤模型大鼠肝脏病理组织学的变化

采用 HE 染色观察 CCl_4 诱导的急性肝损伤大鼠肝脏病理的动态变化, 由肝病理切片图 (图 2) 可以

看出, 空白组大鼠肝脏无明显异常, 模型组大鼠在 CCl_4 处理后, 肝小叶中心细胞坏死, 形成很多空泡, Kupffer 细胞增殖, 有出血和大量中性粒细胞浸润。



A-空白组, B-模型组

A-control group; B-model group

图 2 CCl_4 诱导急性肝损伤大鼠的肝组织病理切片图
Fig. 2 Histopathological slices of liver tissue of rats with CCl_4 -induced acute liver injury

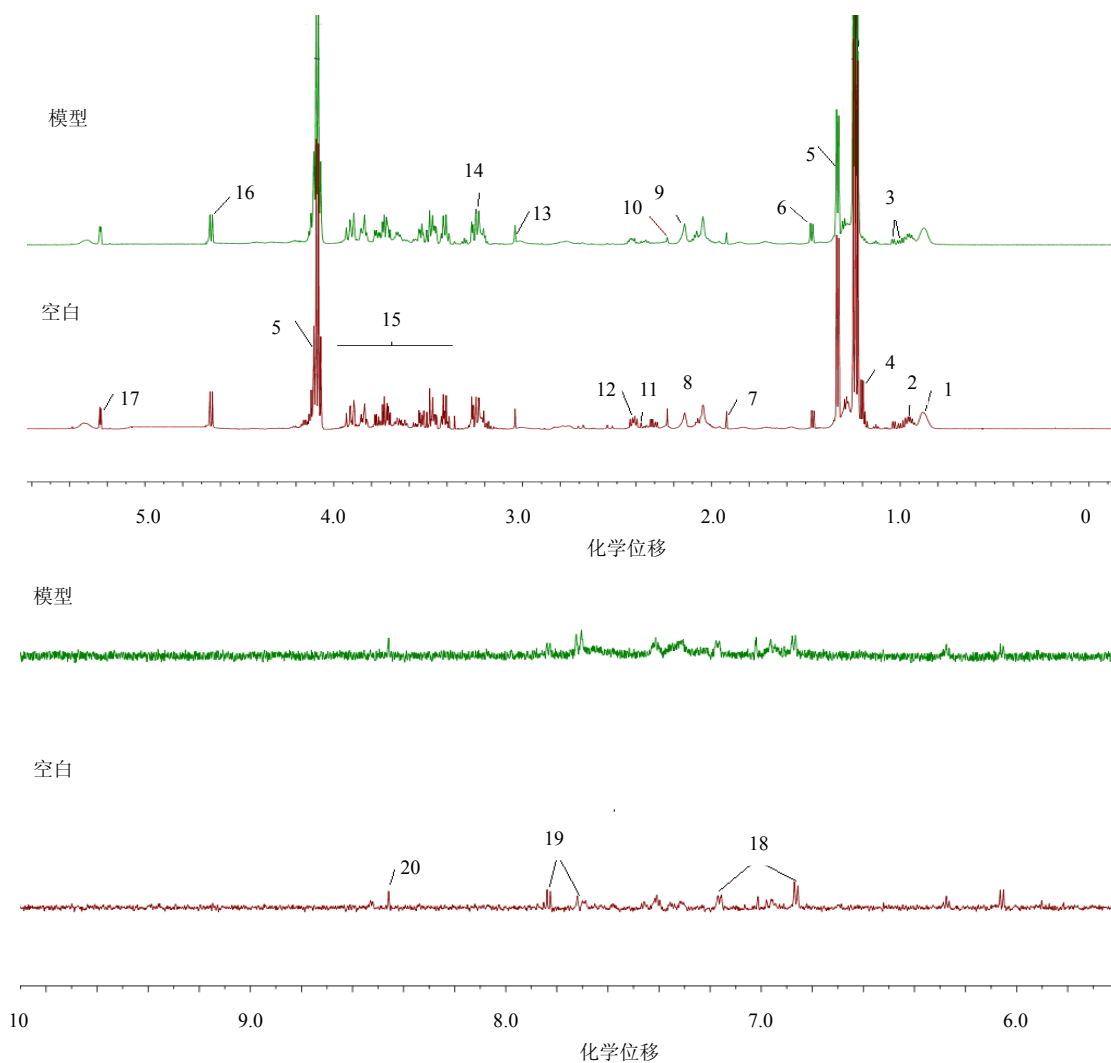
2.3 NMR 代谢组学分析结果

2.3.1 核磁图谱中代谢物的指认 空白组、模型组大鼠血清中小分子代谢物的 CPMG 谱见图 3。根据参考文献^[7-10]鉴定了其中 20 个化合物特征结构片断。

2.3.2 代谢组学分析及潜在代谢标志物的寻找 将归一化后的数据导入 SIMCA-P 多元统计软件, 分别进行 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 分析, 寻找合适的分析模型, 结果见图 4, 由 PCA 得分图可知, 空白组和模型组已有分开的趋势, 空白组组内比较分散, 可能是由正常大鼠个体差异导致; 由 PLS-DA 得分图可见, 空白组与模型组沿 $t[1]$ 轴显著分开; 由 OPLS-DA 得分图可见, 空白组与模型组的差异沿 $t[1]$ 已达到最大化。由以上分析可见, 空白组和模型组的血清代谢轮廓存在明显差异, 表明 CCl_4 造模后大鼠血清中的代谢物发生了明显的变化, CCl_4 造成大鼠体内代谢的紊乱, 说明造模成功, 与生化和肝切片的结果一致; 且模型组样本相对集中, 表明模型组代谢轮廓较一致。

由在 OPLS-DA 的载荷图 (图 5) 中, 离原点较远的那些点 (血清代谢物的化学位移) 对模型和空白组的分离具较大的贡献。可看出, 97 (δ 1.34~1.30)、100 (δ 1.22~1.18)、14 (δ 4.66~4.62)、28 (δ 4.10~4.06) 等区间段内差异较大。

同时结合单变量的统计学分析方法, 对小分子代谢物的主成分分析得到的 loading 图中离原点较远的那些代谢物在空白组和模型组中的峰面积进行独立样本 t 检验, 计算 P 值。只有 $P < 0.05$ 的代谢物为具有统计学意义的潜在生物标志物, 其统计结果见表 1。结果显示, 与空白组大鼠比较, CCl_4 急



1-脂类 (δ 0.88); 2-亮氨酸/异亮氨酸 (δ 0.95, 0.97); 3-缬氨酸 (δ 1.01, 1.04); 4- 3-羟基丁酸 (δ 1.21) 5-乳酸盐 (δ 1.33, 4.09); 6-丙氨酸 (δ 1.48); 7-醋酸盐 (δ 1.92); 8-N-乙酰基糖蛋白 (δ 2.04); 9-O-乙酰基糖蛋白 (δ 2.14); 10-乙酰乙酸盐 (δ 2.24); 11-丙酮酸盐 (δ 2.38); 12-谷氨酰胺 (δ 2.41); 13-肌酐/肌酸 (δ 3.04); 14-氧化三甲胺 (δ 3.25); 15-葡萄糖 (δ 3.37~4.00); 16- β -葡萄糖 (δ 4.65); 17- α -葡萄糖 (δ 5.24); 18-酪氨酸 (δ 6.85, 7.18); 19-色氨酸 (δ 7.72, 7.84); 20-甲酸 (δ 8.46)

1- lipids; 2- leucine/isoleucine; 3- valine; 4- 3-hydroxybutyrate; 5- lactate; 6- alanine; 7- acetate; 8- N-acetyl glycoprotein; 9- O-acetyl glycoprotein; 10- acetoacetate; 11- pyruvate; 12- glutamine; 13- creatine; 14- trimethylamine oxide (TMAO); 15- glucose; 16- β -glucose; 17- α -glucose; 18- tyrosine; 19- tryptophan; 20- formate

图3 代谢物化学位移

Fig. 3 Chemical shift of metabolites

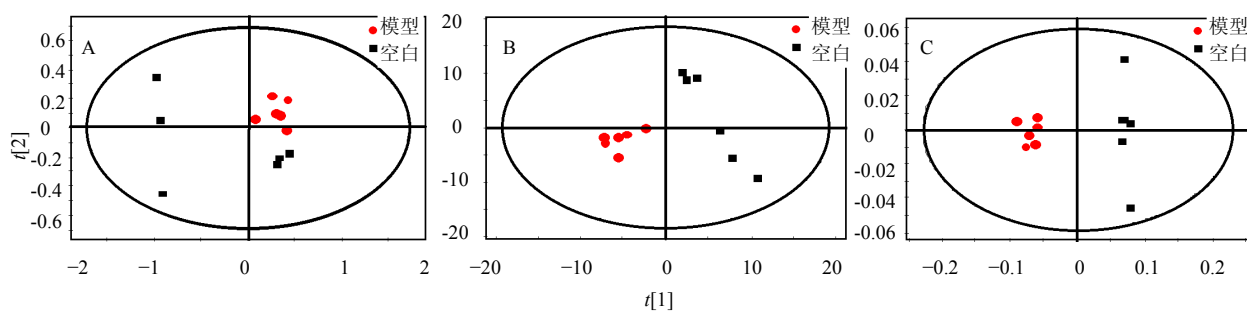


图4 A-NMR 血清 PCA 得分图, B-NMR 血清 PLS-DA 得分图, C-NMR 血清 OPLS-DA 得分图

Fig. 4 PCA scores plot (A), PLS-DA scores plot (B), and OPLS-DA scores plot (C) of NMR serum

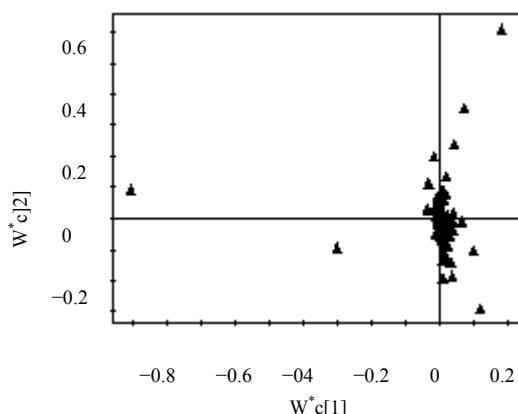


图5 OPLS-DA 载荷图

Fig. 5 Loading plot by OPLS-DA analysis

性肝损伤大鼠血清中7个代谢物有显著性差异,其中,脂类(δ 0.88) ($P < 0.05$)、丙酮酸(δ 2.38) ($P < 0.05$)、 β -葡萄糖(δ 4.65) ($P < 0.05$)、 α -葡萄糖(δ 5.24)含量显著降低($P < 0.01$),而乳酸(δ 4.09)、肌酐(δ 3.04)、丙氨酸(δ 1.48)含量则显著上升($P < 0.01$)。

3 讨论

目前,已有用 GC-MS、LC-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 研究 CCl_4 肝损伤模型报道,黄欣等^[11]运用 GC-MS 代谢组学方法研究了 CCl_4 致小鼠急性肝损伤血浆及肝脏代谢物的变化,发现 CCl_4 致肝损伤与能量代谢、氨基酸代谢和脂类代谢有关;陈汀等^[12]建立了

表1 正常对照组与模型组的差异代谢物 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Different metabolites of normal control and model groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	化学位移 (δ)	变化趋势	峰面积	
			空白组	CCl_4 模型组
α -葡萄糖	5.24	—	$8.26 \times 10^{-3} \pm 3.34 \times 10^{-3}$	$2.69 \times 10^{-3} \pm 1.61 \times 10^{-3**}$
β -葡萄糖	4.65	—	$3.80 \times 10^{-3} \pm 2.63 \times 10^{-3}$	$6.76 \times 10^{-4} \pm 5.07 \times 10^{-4*}$
乳酸	4.09	+	$3.22 \times 10^{-2} \pm 1.04 \times 10^{-2}$	$1.10 \times 10^{-1} \pm 1.70 \times 10^{-2***}$
肌酐/肌酸	3.04	+	$3.32 \times 10^{-3} \pm 2.85 \times 10^{-4}$	$8.22 \times 10^{-3} \pm 1.75 \times 10^{-3***}$
丙酮酸	2.38	—	$3.66 \times 10^{-3} \pm 1.44$	$1.95 \times 10^{-3} \pm 8.55 \times 10^{-4*}$
丙氨酸	1.48	+	$5.44 \times 10^{-3} \pm 2.62 \times 10^{-3}$	$1.05 \times 10^{-2} \pm 2.04 \times 10^{-3**}$
脂类	0.88	—	$3.19 \times 10^{-2} \pm 1.07 \times 10^{-2}$	$1.75 \times 10^{-2} \pm 2.78 \times 10^{-3*}$

与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs blank group

UPLC-TOF-MS 代谢组学技术研究不同剂量 CCl_4 诱导小鼠肝损伤血浆代谢物,找到10个有特征性的内源性生物标志物;但是由于 LC-MS 为软电离,对于不同的物质需要不同的电离强度,因此无法建立一个标准的数据库,而 GC-MS 方法虽然有可供参考、比较的标准谱图库(NIST)可以避免这个问题,但缺点是样品前处理比较繁杂^[13]。因 NMR 代谢组学技术操作简单,指认也比较方便,所以应用起来比较方便。Zira 等^[14]曾运用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学方法研究了 CCl_4 致大鼠急性肝损伤与再生的发生机制,提出了 CCl_4 致大鼠急性肝损伤与再生不仅与能量代谢、氨基酸代谢和脂类代谢有关外,还与转甲基作用有关。本文也应用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学方法研究了高剂量 CCl_4 致大鼠急性肝损伤模型,并利用 OPLS-DA 法判别血清中代谢物谱的模式变化规律,共指认了20个血清代谢物,并确认了6个与 CCl_4 致肝损伤相关的标志物(脂类、葡萄糖、丙酮酸、

乳酸、肌酐、丙氨酸)。

本文结果表明,用 CCl_4 诱导大鼠急性肝损伤后,大鼠血清中的脂类、葡萄糖、丙酮酸等含量降低,而乳酸、肌酐、丙氨酸等含量上升。其中,血清中葡萄糖含量降低,乳酸盐含量升高说明机体糖无氧代谢(即糖酵解)加强,这与 Kuwahata 等^[15]报道的“肝细胞损伤后,糖代谢的改变和胰岛素的增多使得血液中糖的含量降低”一致;丙酮酸是三羧酸循环的源头,其含量降低说明三羧酸循环加快,这些与黄欣等^[11]报道一致;ATP-磷酸肌酸系统是细胞能量转换的关键, CCl_4 干扰后肌酐含量上升,说明 CCl_4 影响了能量代谢,这也与黄欣等^[11]报道的一致;肝脏作为氨基酸代谢的中心,任何肝损伤都可能干扰氨基酸的代谢,比如丙氨酸,在受到 CCl_4 侵扰后含量升高,黄欣等^[11]认为血液游离氨基酸含量升高,可能是由于机体 CCl_4 中毒后影响了蛋白质的合成;Zira 等^[14]则认为氨基酸含量的升

高可能是由于肌蛋白水解,也可能是肝组织坏死。另外,本文还发现血清中脂类含量降低,这可能也与 CCl₄ 致肝损伤有关,抑制了脂类物质经肝脏进入血清的过程;而 Zira 等^[14]则认为血浆中脂类含量降低与腹腔注射 CCl₄ 后降低了血液中的三酰甘油和脂肪蓄积有关。

由于, NMR 代谢组学方法只能检测到血清中的小部分内源性小分子代谢物,对代谢物的全面检测也还有待于 GC-MS、LC-MS 等多种方法的综合分析,以便更全面、更系统地解释体内变化过程。

参考文献

- [1] 仲来福, 张瑾岗, 张富勤, 等. 四氯化碳诱导大鼠肝损伤的机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3(4): 298-303.
- [2] 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.
- [3] Wu H, Xue R Y, Dong L, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 648(1): 98-104.
- [4] 冯越, 张许, 刘买利. 代谢组学方法分析鸡胚胎发育过程中脑代谢物 [J]. 波谱学杂志, 2009, 26(1): 27-36.
- [5] Liu X J, Zhou Y Z, Li Z F, et al. Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: a plasma metabonomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 64(4): 578-588.
- [6] 芦林林, 周玉枝, 马致洁, 等. 应用基于 ¹H NMR 的代谢组学评价逍遥散的抗抑郁有效组分 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 225-230.
- [7] Tang H, Wang Y, Nicholson J K, et al. Use of relaxation edited one dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma [J]. *Anal Biochem*, 2004, 325(2): 260-272.
- [8] Wu Q F, Zhang Q, Sun B, et al. ¹H NMR-based metabonomic study on the metabolic changes in the plasma of patients with functional dyspepsia and the effect of acupuncture [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(3): 698-704.
- [9] Lenz E M, Bright J, Wilson I D, et al. A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(5): 1103-1115.
- [10] Shin J H, Yang J Y, Jeon B Y, et al. ¹H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with mycobacterium tuberculosis [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2238-2247.
- [11] 黄欣, 龚益飞, 王毅, 等. 代谢组学方法研究水飞蓟宾对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(4): 714-719.
- [12] 陈汀, 姚卫峰, 张丽, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱的 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠血浆代谢组学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 98-101.
- [13] 林景超, 贾伟, 阎超. 化学性肝损伤及肝癌的代谢组学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [14] Zira A, Kostidis S, Theocharis S et al. ¹H NMR-based metabonomics approach in a rat model of acute liver injury and regeneration induced by CCl₄ administration [J]. *Toxicology*, 2013, 303: 115-124.
- [15] Kuwahata M, Tomoe Y, Harada N, et al. Characterization of the molecular mechanisms involved in the increased insulin secretion in rats with acute liver failure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(1): 60-65.