

黄芪皂苷干预脾虚水湿不化证大鼠的代谢组学研究

刘阿娜¹, 崔宁², 赵文晓², 陈述东¹, 季旭明², 王世军², 蒋海强^{3*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355

3. 山东中医药大学 实验中心, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 研究黄芪皂苷组分干预脾虚水湿不化证大鼠血浆内源性代谢物的变化, 探求黄芪皂苷组分对脾虚水湿不化证的干预作用。 **方法** 采用高效液相-飞行时间质谱仪检测大鼠血浆内源性代谢物信息, 利用主成分分析和偏最小二乘判别分析研究对照组、模型组以及黄芪皂苷组之间的代谢差异, 确定潜在生物标志物。 **结果** 对照组、模型组以及黄芪皂苷组代谢模式明显不同, 共鉴定 11 个生物标志物, 其通路主要涉及甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、淀粉与蔗糖代谢和花生四烯酸代谢等。 **结论** 黄芪皂苷组分可能通过干预溶血磷脂酰胆碱导致的脂肪代谢紊乱、脂肪酸进入线粒体减少导致的能量供给不足、肠道功能失调等一系列代谢紊乱对脾虚水湿不化证起到治疗作用。

关键词: 黄芪皂苷; 脾虚水湿不化证; 代谢组学; 高效液相色谱-飞行时间质谱; 脂肪代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)24-4401-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.018

Intervention effects of *Astragalus* saponins on spleen deficiency syndrome rats based on metabonomic research

LIU A-na¹, CUI Ning², ZHAO Wen-xiao², CHEN Er-dong¹, JI Xu-ming², WANG Shi-jun², JIANG Hai-qiang³

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. College of traditional Chinese medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Experience Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: **Objective** Effect of *Astragalus* saponins on the changes of endogenous metabolites in plasma of rats with spleen deficiency syndrome of dampness and the intervention function of *Astragalus Radix* saponins on the syndrome was studied. **Methods** High performance liquid phase of flight time mass spectrometry was used to detect the information of endogenous metabolites in rat plasma, principal component analysis and partial least-squares discriminate analysis were used to study the metabolic differences between normal group, model group, and astragalus saponins group to identify potential biomarkers. **Results** The metabolism pattern of normal group, model group, and *Astragalus* saponin group were significantly different, 11 biomarkers were identified and the pathway mainly involved glycerol phospholipids metabolism, sphingolipid metabolism, pentose glucuronic acid conversion, and peanut arachidonic acid metabolism. **Conclusion** The results of this study show that it is possible for *Astragalus Radix* saponins group to interfere with the spleen deficiency syndrome of dampness by regulating energy metabolism, lipid metabolism, and fatty acid metabolism to exert therapeutic effect.

Key words: *Astragalus Radix* saponin; dampness retention due to spleen deficiency; metabonomics; high performance liquid chromatography coupled with TOF/MS; lipid metabolism

黄芪始载于《神农本草经》,味甘,性温,归脾、肺经,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿等功效^[1],黄芪因具有健脾利水^[2-3]的功效可适用于气

虚乏力、食少便溏以及脾肺气虚和水湿内停导致的水肿,为补益脾气之要药,对脾气虚以及运化失常导致的食少、倦怠乏力等症状有效^[4]。黄芪中化

收稿日期: 2016-06-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)课题(2013CB5318000)

作者简介: 刘阿娜(1992—)女,在读硕士,从事中药及复方活性成分研究。Tel: 15628959102 E-mail: 1525688831@qq.com

*通信作者 蒋海强(1982—),男,副教授,硕士研究生导师,研究方向为中药及复方活性成分及代谢组学研究。E-mail: jhq12723@163.com

学成分主要有多糖、黄酮类及皂苷类等,其中皂苷类是黄芪的主要活性成分之一,药理研究表明黄芪皂苷具有改善胃肠功能、促进水液代谢、改善物质代谢、调血脂等作用,赵文晓等^[5]研究发现黄芪及其各拆分组分具有治疗脾虚水湿不化证的作用。

脾主运化,统血,升清,输布水谷精微,为“气血生化之源”。脾气虚则导致水谷精微运化失灵、水液停滞体内而引起体内各种物质代谢紊乱,因此治疗脾虚水湿不化证最重要的是调脾并辅以祛湿^[5]。现代研究脾虚水湿不化证常采用单一的生化指标如血清胃泌素、尿 D-木糖排泄率、小肠推进率等^[6],而这些指标难以系统全面地解释疾病的发病机制以及药物的干预机制。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,能够灵敏地揭示生物体内源性物质受刺激后引起代谢物的扰动,其着眼于把研究对象作为一个整体来研究,可系统全面地解释疾病的发病机制,对疾病的个性化诊治具有重要意义^[7],这与中医理论的整体观念相契合,近些年来广泛地应用于中医证候机制研究,为解释中医中药干预疾病的作用机制提供了有利的证据^[8-9]。液质联用技术因具有高灵敏度、高精密度以及良好的重现性等特点,已成为代谢组学研究中检测信息最常用的工具之一^[10]。

因此本研究利用液质联用的代谢组学技术研究黄芪皂苷干预后脾虚水湿不化证大鼠血浆内源性代谢物的变化,寻找血浆中的代谢标志物,从代谢组学角度解析黄芪皂苷组分对脾虚水湿不化证大鼠的干预作用,以期发现黄芪皂苷组分是否为黄芪健脾利水的物质基础,为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱(美国 Agilent 公司,配有在线真空脱气机、四元泵、柱温箱和检测器);Agilent6230 型飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司,配有标准电喷雾离子源);VORTEX-GENIE 2 型涡旋仪(美国 SI 公司),凯特 TD5A 型离心机(盐城凯特实验仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪皂苷组分(自制,经 HPLC-ELSD 定量测定,含黄芪甲苷 4.40 mg/g、黄芪皂苷 I 0.28 mg/g、黄芪皂苷 II 1.42 mg/g、黄芪皂苷 III 1.31 mg/g)。乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司);水为 Milli-Q 超纯水。

1.3 动物

健康 Wistar 大鼠 30 只,体质量(150±20)g,雌雄各半,购自鲁抗医药集团股份有限公司实验动物中心(许可证编号 SCXK 鲁 20130001)。

2 方法

2.1 大鼠造模方法、评价指标及分组给药

Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后,分为对照组和实验组。对照组以纯化饲料进行饲养,实验组依据《中药治疗脾虚证的临床研究指标原则》和《中医湿病学》^[11-12]而采用“饮食失节(高脂低蛋白饮食)+劳倦过度(负重游泳)”复合因素诱导,建立脾虚水湿不化证大鼠模型。造模成功^[13-15]后将实验组分为模型组与黄芪皂苷组,黄芪皂苷组给予黄芪皂苷组分(0.27 g/kg),对照组与模型组给予相同体积的生理盐水,每天 ig 给药 1 次,连续 2 周。给药过程中因环境、饮食等各种不同原因,各组大鼠中均出现死亡,至给药结束后对照组剩 9 只、模型组剩 9 只、黄芪皂苷组剩 7 只,最终 25 只大鼠纳入实验用。

2.2 血浆样品的采集与处理

给药结束后大鼠腹腔下腔静脉取血,肝素钠抗凝,离心 15 min,取上层,作为血浆样本。-80 ℃冰箱保存。用时室温解冻,精密移取 300 μL,加入 600 μL 甲醇,置涡旋仪涡旋 1.5 min,4 000 r/min 离心 15 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后分析。

2.3 数据质量评价

将所有血清样本取少量混合制成质控(QC)样本,处理方法同“2.2”项。在样品检测前进行 5 次 QC 样本,使系统平衡,之后每隔 6 个样品插入一个 QC 样本进行检测,将获得的 QC 样本数据矩阵进行主成分分析(PCA),观察 QC 样品聚类效果从而评估数据质量的可靠性。

2.4 血浆样品的分析条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Halo-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm),经色谱条件优化,流动相 A 为 0.05%甲酸水, B 为 0.05%甲酸乙腈;梯度洗脱: 0~10 min, 90%~70% A; 10~20 min, 70%~40% A; 20~28 min, 40% A; 28~38 min, 40%~20% A; 38~43 min, 20%~0 A; 进样量 5 μL; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 25 ℃。

2.4.2 质谱条件 ESI 源, 正离子模式, 干燥气温度 350 ℃, 干燥气体积流量 10 L/min, 毛细管电压 4 000 V, 雾化气压力为 241.325 kPa (35 psi), 碎裂电压 140 V, 质荷比扫描范围: 50~1 000 m/z。选

取 m/z 121.050 873 和 922.009 798 作为参比离子。

2.5 代谢组学数据处理

2.5.1 数据预处理 将质谱原始数据导入安捷伦定性分析软件 (Agilent Masshunter Qualitative Analysis workstation, 美国 Agilent 公司) 中进行分子特征查找, 包括滤噪 (峰高 500)、保留时间校正 (0.2 min) 和离子归类等, 最后根据特征归类, 将原始数据 “.d” 格式转换成 “.cef” 格式。“cef” 数据输入 Mass Profiler Professional (美国 Agilent 公司, MPP) 软件中处理, 滤噪 (最小绝对丰度 5 000), 峰对齐 (保留时间范围 0.2 min), 基线校准, 数据归一化以及过滤。过滤包括标记过滤和频度过滤, 其中标记过滤器初始设置为化合物至少在 2 个样本中出现否则剔除, 而频度过滤器根据 80% 的原则剔除不符合化合物。

2.5.2 统计分析 获得的二维数据矩阵包括变量 (质荷比和保留时间)、峰强度、样本, 以 txt 格式导入到 Metaboanalyst 网络分析平台 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行 PCA 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA), 用各组变量投影的重要性参数 (VIP) 来筛选潜在的生物标记物 (VIP 值越大则表明 2 组间的差异越大), 筛选出的 $VIP > 1$ ^[16] 的变量以 xls 格式导入到 MPP 中进行 ANOVA 分析 ($P < 0.05$) 以及对数转换 (fold change, $FC > 2$), 筛选出 $P < 0.05$ 的变量 ($P < 0.05$ 则表明各代谢物间具有差异性)。本实验将 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 以及 $FC > 2$ 的代谢物作为候选的潜在的生物标志物。

2.5.3 标志物鉴定 将用 MetaboAnalyst 和 MPP 处

理后筛选出的 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 、 $FC > 2$ 的变量的精确相对分子质量采用 HMDB (<http://www.hmdb.ca>)、METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) 和 KEGG (<http://www.kegg.com>) 数据库进行检索, 并结合相关文献来鉴定潜在的生物标志物的结构。

3 结果

3.1 一般状况

对照组大鼠反应敏捷、体肌健壮、被毛密泽、摄食正常。模型组大鼠于 1 周后表现出倦怠懒动、皮毛干枯、毛发竖立、蓬乱、光泽度降低、耳色及爪色淡白、皮毛污秽、体质量下降等状况。与模型组比较, 黄芪皂苷组大鼠神倦乏力、消瘦等症状均有所改善。

3.2 血浆样品的分离与分析

采用 HPLC-TOF-MS 进行血浆样品的分离和数据采集, 图 1 为大鼠血浆样品正离子模式下的总离子流色谱图 (TIC)。从图中可以看出, 大部分色谱峰保留时间基本一致, 但有几个色谱峰的保留时间发生漂移, 故需要进行数据预处理。

3.3 数据质量评估结果

本实验分析过程中共插入 6 个 QC 样品, 将获得的检测数据进行预处理和 PCA 分析, 结果见图 2, 正离子模式下 6 个 QC 样品明显地聚在一起, 并集中分布于 95% 可信区间内, 表明数据质量可靠。

3.4 数据结果分析

数据预处理后共得 3 100 个变量, 利用无监督的 PCA 对预处理后对照组、模型组之间的差异进行统计学分析, PCA 得分图 (图 2) 中模型组与对照组明显分离, 表明 2 组大鼠血浆代谢模式发生变

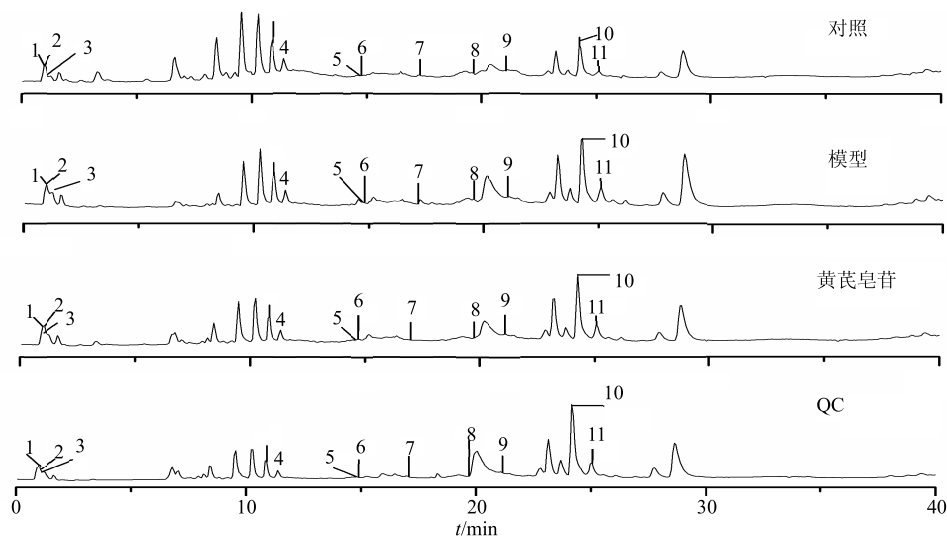


图 1 各组大鼠血浆总离子流图

Fig. 1 TIC of plasma of rats in each group

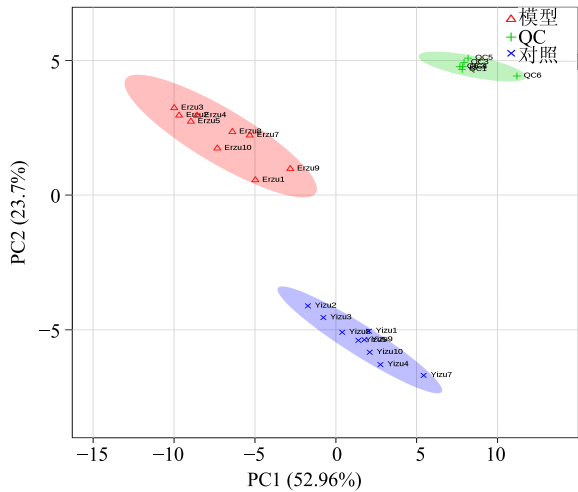


图 2 对照组、模型组和 QC 血浆样品 PCA 得分图
Fig. 2 PCA scores-plot of rat plasma of control, model, and QC samples

化。为进一步寻找 3 组之间的差异变量,采取 PLS-DA 进行进一步的统计学分析。PLS-DA 得分图 (图 3) 显示 3 组组内聚类紧密,组间分离较好,黄芪皂苷组在得分图中趋于对照组,表明给予黄芪皂苷组分后脾虚水湿不化证大鼠血浆内源性代谢模式发生改变,从一定程度上说明黄芪皂苷对调节脾虚水湿不化证大鼠的代谢异常有一定的作用。进一步对 PLS-DA 进行模型验证,结果见图 4。在建立的模型中,原始值 $R^2_Y=0.985$ 、 $Q^2=0.957$, R^2 、 Q^2 的截距为 $R^2=(0, 0.346)$, $Q^2=(0, -0.380)$, Q^2 在纵轴上的截距为负值,且最右端的两个值差距小,表明实验所建立的模型未发生过拟合,证明模型有效,可进一步分析^[17]。

3.5 潜在生物标志物的鉴定

经过查询 HMDB、METLIN 和 KEGG 数据库

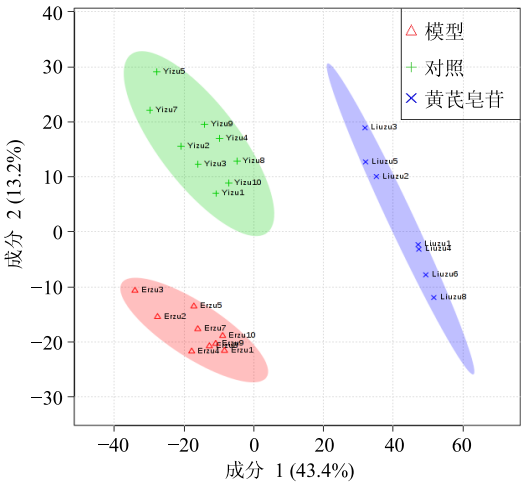


图 3 各组大鼠血浆 PLS-DA 得分图
Fig. 3 PLS-DA scores-plot of rat plasma of each group

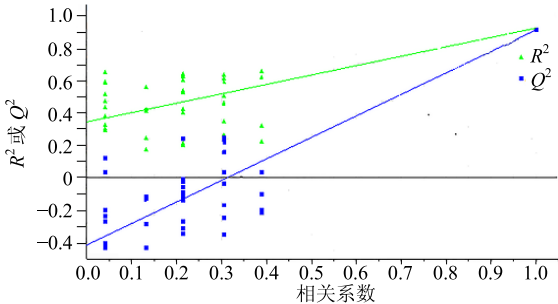


图 4 PLS-DA 模型排列检验图
Fig. 4 PLS-DA corresponding validation plot

并与原始色谱图及质谱图的保留时间、相对分子量及相关文献进行比对^[18-19]后,最终鉴定出 11 个代谢产物 (表 1)。为更直观地表示黄芪皂苷组分对筛选出的代谢物的干预作用,将筛选出的 11 种代

表 1 大鼠血浆中生物标志物鉴定结果及其相关代谢通路
Table 1 Identification of biomarkers and its metabolism pathway

峰号	t_R/min	精确相对分子质量	KEGG	鉴定结果	变化趋势		代谢通路
					模型/对照	给药/模型	
1	1.020	253.117	C00148	L-脯氨酸	↑	↓	精氨酸和脯氨酸代谢
2	1.040	177.064	C03033	6-脱氢葡萄糖醛酸	↑	↓	淀粉与蔗糖代谢
3	1.170	198.092	C00427	前列腺素 H ₃	↑	↓	花生四烯酸代谢
4	11.430	340.260	C00836	鞘氨醇	↓	↑	鞘酯代谢
5	14.820	353.247	C16513	二十二碳五烯酸	↑	↓	不饱和脂肪酸的生物合成
6	14.850	446.289	—	3-羟基异戊酰肉碱	↓	↑	脂肪酸分解代谢
7	17.040	107.054	C06212	N-甲基-5-羟色胺	↓	↑	色氨酸代谢
8	19.910	900.586	C06126	神经酰胺 (d18 : 1/16 : 0)	↑	↓	鞘酯代谢
9	21.080	337.234	C14828	9,10-二羟基-十八碳烯酸	↑	↓	亚油酸代谢
10	24.420	648.289	C04230	溶血磷脂酰胆碱 [22 : 4 (7Z,10Z,13Z,16Z)]	↑	↓	甘油磷脂代谢
11	25.120	519.611	C04230	溶血磷脂酰胆碱 [18 : 2 (9Z,12Z)]	↑	↓	甘油磷脂代谢

↑ - 上调; ↓ - 下调
↑ - up-regulation; ↓ - down-regulation

谢物的峰强度的标准化数据进行比较,与对照组相比,模型组中溶血磷脂酰胆碱[18:2(9Z,12Z)]、溶血磷脂酰胆碱[22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]、二十二碳五烯酸、9,10-二羟基-十八碳烯酸、神经酰胺(d18:1/16:0)、前列腺素H₃、L-脯氨酸、6-脱氢葡萄糖醛

酸8种代谢物呈升高趋势,3-羟基异戊酰肉碱、鞘氨醇、N-甲基-5-羟色胺异戊酰肉碱3种代谢物呈下降趋势,而黄芪皂苷组分干预后趋向于对照组水平,说明黄芪皂苷组分对脾虚水湿不化证大鼠内源性代谢产物有调节作用,结果见图5。

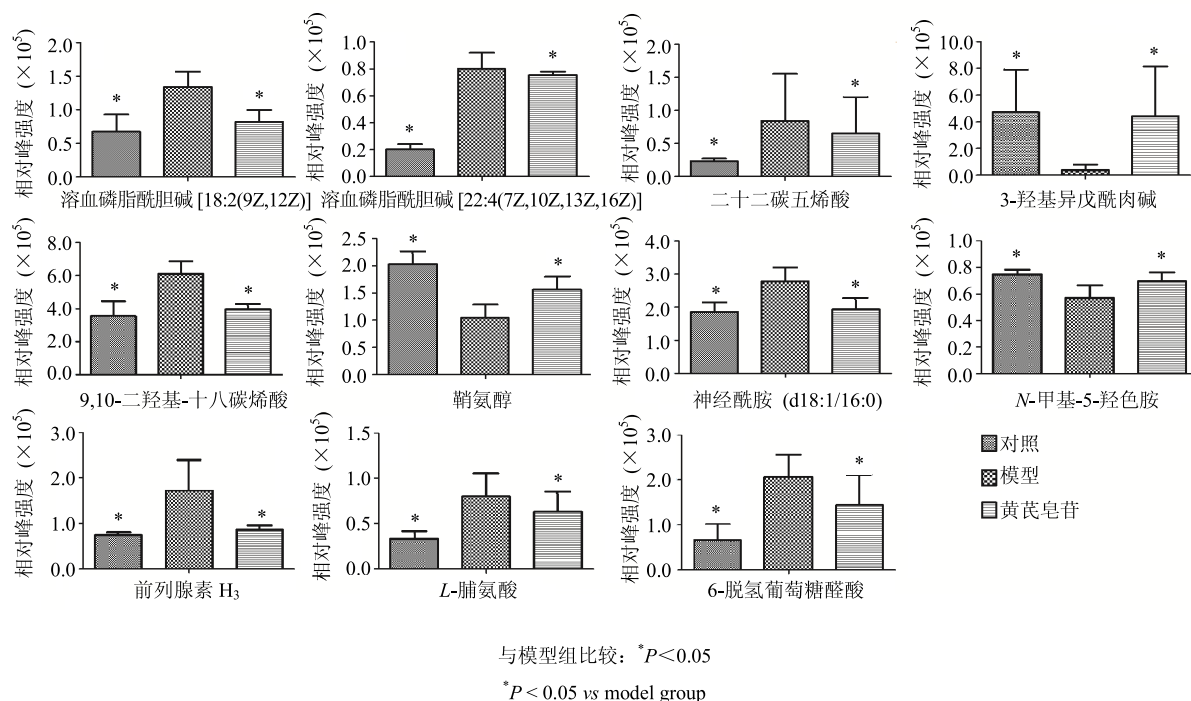


图5 各组大鼠血浆中不同生物标志物的比较

Fig. 5 Relative peak areas of biomarkers with difference in plasma of rats in each group

4 讨论

本研究应用液质联用代谢组学技术研究黄芪皂苷组分干预脾虚水湿不化证大鼠的作用机制,发现干预后溶血磷脂酰胆碱(2种)、二十二碳五烯酸、9,10-二羟基-十八碳烯酸、半乳糖神经酰胺、6-脱氢葡萄糖醛酸、前列腺素H₃以及L-脯氨酸8种代谢物下调,3-羟基异戊酰肉碱、鞘氨醇以及N-甲基-5-羟色胺3种代谢物上调,提示脾虚水湿不化证大鼠体内脂类、能量、氨基酸等代谢紊乱,且脂类代谢紊乱最为严重。本研究将筛选出的代谢物及相关代谢通路构建了黄芪皂苷组分干预脾虚水湿不化证大鼠的相关代谢网络示意图,结果见图6。

本实验前期研究表明脾虚水湿不化证大鼠体内血脂水平相较于正常组血脂升高^[5],表明脾虚水湿不化证与脂肪代谢相关,且本实验中发现的生物标志物大部分与脂类代谢相关。

甘油磷脂代谢:与对照组大鼠相比,脾虚水湿不化证大鼠体内溶血磷脂酰胆碱的量上调,经黄芪

皂苷组分干预后量下调。溶血磷脂酰胆碱[22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]、溶血磷脂酰胆碱[18:2(9Z,12Z)]为溶血磷脂酰胆碱,属于卵磷脂类化合物,在机体的生长、繁殖、细胞识别、消除细胞间信息的传递以及能量转化密切相关^[20]。正常饮食状态下供能的主要方式是糖、蛋白质以及脂肪分解代谢,但在长期高脂低蛋白饮食状态下会使糖以及蛋白质摄入不足而引起营养不良,机体供能主要由脂肪分解代谢提供^[21],溶血磷脂胆碱能够增加脂肪燃烧从而增加脂肪来源的能量供给^[22]。但会导致脂肪代谢紊乱^[23]。

杨宇峰等^[18]在利用代谢组学研究脾肾气虚证时发现患者血浆中溶血磷脂酰胆碱与正常组相比亦有上调的趋势,与本实验研究结果一致。脾虚水湿不化证大鼠体内溶血磷脂酰胆碱类内源性代谢物水平上调,而黄芪皂苷组分能够阻断这一过程,使机体脂肪代谢恢复正常。

脂肪酸代谢:3-羟基异戊酰肉碱属于脂肪酰肉碱,脂肪酰肉碱由脂肪酸与肉碱结合生成。肉碱是

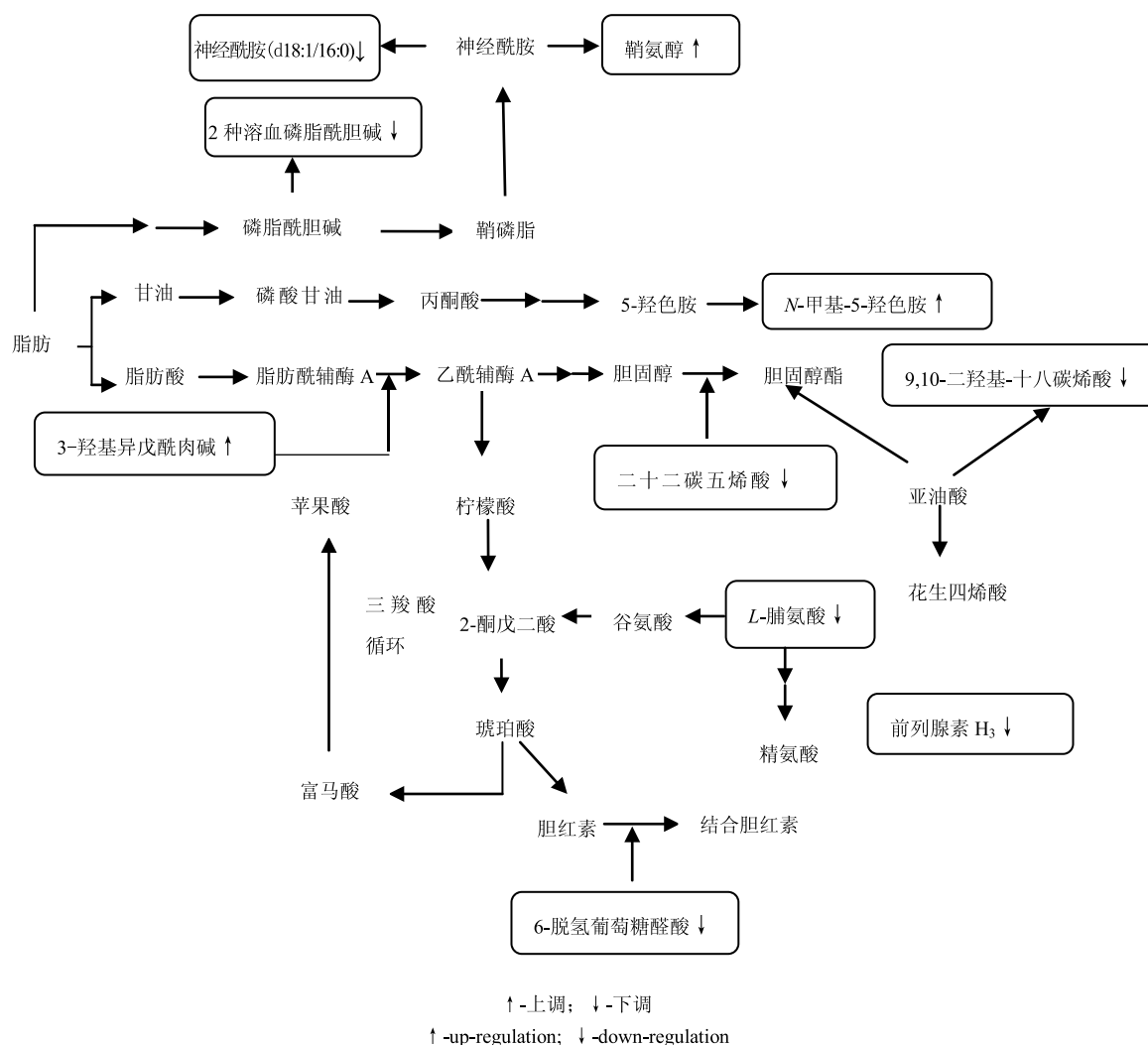


图6 生物标志物的代谢途径图

Fig. 6 Metabolic pathway map of biomarkers

一种类维生素的营养素,由赖氨酸和蛋氨酸经过一系列酶促反应在肝脏和肾脏中合成,是人体组织脂肪酸代谢的重要辅助因子^[24]。脂肪酸在脂肪酰辅酶A合成酶的作用下生成脂肪酰辅酶A,后者与肉碱结合生成脂肪酰肉碱(3-羟基异戊酰肉碱)而使脂肪酸通过线粒体内膜进入线粒体基质进行 β -氧化,脂肪酸氧化的最终产物为乙酰辅酶A,其在三羧酸循环中降解为二氧化碳和水,产生ATP而供能^[21]。脾虚水湿不化证大鼠体内3-羟基异戊酰肉碱的量降低,可推断肉碱与脂肪酸结合减弱,脂肪酸不能进入线粒体,降低了脂肪酸的氧化代谢,能量供给减少,而黄芪皂苷组干预后脂肪酰肉碱的量上调,脂肪酸氧化代谢恢复正常,能量供给正常。

氨基酸代谢:与对照组相比脾虚水湿不化证大鼠体内脯氨酸上调,脯氨酸在体内有多条代谢途

径:(1)脯氨酸在体内合成精氨酸,而精氨酸具有增强肠道免疫,促进肠道发育,维持肠黏膜组织完整性和生理功能^[5],《脾胃论》曰“大肠主津”“小肠主液”,肠道与水液代谢密切相关,肠道功能增强可促进水液代谢,进而减少体内水湿,脾虚引起水湿,而体内水湿不化又可加重脾虚,肠道功能增强、水湿减少可减轻脾的负担而利于脾脏功能恢复^[5]。(2)脯氨酸为生糖氨基酸,能通过转氨作用脱掉氨基生成有机酸,再经过分解代谢反应而生成2-酮戊二酸,参与三羧酸循环而提供能量^[25],本实验中经黄芪皂苷组干预后脯氨酸的量上调,脯氨酸从维护肠道功能正常以及生糖参与三羧酸提供能量来发挥治疗作用。

不饱和脂肪酸代谢:与对照组相比模型组大鼠体内二十二碳五烯酸缺乏。二十二碳五烯酸是一种

长链不饱和脂肪酸,在体内主要参与胆固醇的氧化和运输,不饱和脂肪酸能够酯化胆固醇,降低血液中胆固醇与三酰甘油的量^[26]。脾虚水湿不化证大鼠体内不饱和脂肪酸减少,使之与胆固醇结合减少,而使胆固醇代谢减少,致使体内胆固醇代谢紊乱。而经黄芪皂苷组分干预后,二十二碳五烯酸的量上调,趋向于对照组水平,且本实验中黄芪皂苷组大鼠体内血脂降低^[5],因此黄芪皂苷组分通过调节二十二碳五烯酸从而促进体内胆固醇代谢,使之恢复正常,减弱脾的负担而发挥治疗作用。

综上所述,脾虚水湿不化证大鼠发病过程中存在溶血磷脂酰胆碱导致的脂肪代谢紊乱、脂肪酸不能进入线粒体导致的能量供给不足、肠道功能失调等一系列代谢紊乱,代谢组学研究发现黄芪皂苷组分可通过调节以上代谢通路发挥其健脾、利水功效从而对脾虚水湿不化证大鼠具有一定的治疗作用,故推测黄芪皂苷组分是黄芪健脾利水功效的物质基础之一。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李 森, 谢人明, 孙文基. 茯苓、猪苓、黄芪利尿作用的比较 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 264-267.
- [3] 高秀兰, 赵荣华, 谢 鸣, 等. 黄芪对脾虚发热大鼠的作用 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 111-114.
- [4] 崔 宁, 赵文晓, 王世军, 等. 基于肝基因表达谱分析的黄芪及其拆分组对脾虚水湿不化大鼠脂质代谢影响的机制研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(12): 1819-1823.
- [5] 赵文晓. 黄芪及拆分组对脾虚水湿不化模型大鼠的影响及分子机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [6] 张桐茂, 刘 炜, 唐 方, 等. 藿香正气软胶囊对功能性消化不良脾虚湿盛患者胃动力及胃肠激素的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2214-2217.
- [7] 郭 慧, 崔 扬, 王秋红, 等. 代谢组学技术在中药药性理论研究中的应用概述 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 363-368.
- [8] 高家荣, 庄星星, 魏良兵, 等. 基于 UPLC/QTOF-MS 技术的丹蛭降糖胶囊在 2 型糖尿病大鼠体内尿液代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2096-2103.
- [9] 张艳花, 王东琴, 李晓伟, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 11-16.
- [10] 王斯婷, 李晓娜, 凌笑梅, 等. 代谢组学及其分析技术 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1792-1799.
- [11] 王彦晖. 中医湿病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [12] 吴咸中, 高金亮. 脾虚证的现代研究 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992.
- [13] 崔 宁, 赵文晓, 王世军, 等. 黄芪及其拆分组对脾虚水湿不化大鼠肝脏功能的影响 [J]. 中医药信息, 2015, 32(2): 62-65.
- [14] 赵文晓, 崔 宁, 王世军, 等. 黄芪及拆分组对脾虚水湿不化模型大鼠的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(3): 268-270.
- [15] 高 洁, 韩冰冰, 王世军, 等. 复合造模因素诱导脾虚水湿不化模型大鼠胃肠功能的改变 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(9): 1999-2000.
- [16] Chong I G, Jun C H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present [J]. *Chemom Int Lab Syst*, 2005, 78(1/2): 103-112.
- [17] 夏小涛, 孙 宁, 秦雪梅, 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.
- [18] 杨宇峰, 齐艳文, 石 岩, 等. 脾气虚证代谢综合征大鼠血液代谢组学研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(8): 1056-1058.
- [19] 杨宇峰, 杨晓阳, 石 岩. 脾肾气虚证代谢综合征大鼠血液代谢组学研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1786-1788.
- [20] 亢爱春, 霍 勇, 齐丽彤. 溶血磷脂酰胆碱在动脉粥样硬化中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(12): 1083-1086.
- [21] 李 民, 吴泽明, 黎介寿. 营养不良大鼠血浆小分子物质代谢组学的研究 [J]. 肠外与肠内营养, 2008, 15(5): 259-263.
- [22] 初 艳. 基于血浆代谢组学的脾气虚证本质研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
- [23] Zhang Y, Huang C, Sheng X, et al. Lecithin promotes adipocyte differentiation and hepatic lipid accumulation [J]. *Inter J Molecul Med*, 2009, 23(4): 449-454.
- [24] 张 钧. 肉碱在心血管疾病发生中的作用 [J]. 心血管康复医学杂志, 2004, 12(6): 565-566.
- [25] 吴美音. 补中益气汤治疗“脾气虚证”的代谢组学及药效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [26] 辛 华, 江清林, 牟洪香. 液相色谱质谱方法对前列腺癌患者治疗前后血清中代谢组学的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(1): 74-75.