

基于 GC-MS 代谢组学姜炮制-配伍治疗寒饮伏肺哮喘大鼠的作用机制研究

姚梦雪^{1,2}, 冉 珊^{2,3}, 孙方方², 宋 燕², 汪小莉¹, 韩燕全^{2*}, 洪 燕^{1*}

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031

2. 安徽中医药大学第一附属医院 国家中医药管理局中药制剂三级实验室/中药复方安徽省重点实验室/现代药物制剂安徽省工程技术中心, 安徽 合肥 230031

3. 复旦大学附属金山医院 临床药理学, 上海 200540

摘要: **目的** 从代谢组学角度对姜炮制-配伍机制进行初步探索。**方法** 采用卵清白蛋白(OVA)+冰水浴法建立寒饮伏肺哮喘大鼠模型, 随机分为对照组、模型组、苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤组(SJF/GJF/PJF)及阳性药桂龙咳喘宁组(PC), 给药后进行大鼠肺组织 HE 染色、肺泡灌洗液(BALF)炎性细胞计数, 测定血清免疫球蛋白 E(IgE)、白细胞介素-4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)水平; 同时采用 GC-MS 代谢组学技术进行非靶向代谢组学研究, 寻找寒饮伏肺哮喘大鼠血清、尿液相关差异性代谢物, MetaboAnalyst 构建相关代谢通路。**结果** 苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤可改善大鼠肺组织病理变化, 显著降低大鼠 BALF 炎性细胞计数及血清中 IgE、IL-4 水平, 升高血清中 IFN- γ 水平; 与对照组相比, 寒饮伏肺哮喘大鼠体内共筛选出 37 种差异性代谢物(血清中 15 个、尿液中 22 个), MetaboAnalysis 通路分析发现 7 条代谢通路可能与寒饮伏肺哮喘有关, 涉及能量代谢、氧化应激等。苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤干预后大鼠整体代谢轮廓趋向正常水平; 且苓甘五味(干)姜辛汤治疗寒饮伏肺哮喘作用优于苓甘五味(生/炮)姜辛汤。**结论** 苓甘五味姜辛汤方中姜炮制成干姜入药治疗寒饮伏肺哮喘更为合理, 其机制可能通过调节能量代谢、氧化应激等发挥作用。

关键词: 姜; GC-MS; 代谢组学; 寒饮伏肺哮喘; 炮制-配伍; 苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)03-0669-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.017

Mechanism of processing-compatibility of ginger in treating cold asthma rat by gas chromatography-mass spectrometry based on metabolomics

YAO Meng-xue^{1,2}, RAN Shan^{2,3}, SUN Fang-fang², SONG Yan², WANG Xiao-li¹, HAN Yan-quan², HONG Yan¹

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

2. Grade Three-level Laboratory of TCM Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine/Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula/Engineering Technology Research Center of Modernized Pharmaceutics, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

3. Department of Clinical Pharmaceutics, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200540, China

Abstract: Objective To investigate the effects of processing and compatibility of ginger for the treatment of cold asthma rats at the metabolomics level by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** The rats of cold asthma were established by ovalbumin (OVA) + ice water bath. The rats divided randomly into the control group, model group, Linggan Wuwei (fresh/dry/stir-frying) Jiangxin Decoction group and the positive drug Guilong Kechuaning group. The pathological changes of lung tissue were observed by HE staining; The inflammatory cell count in BALF and the content of IgE, IL-4 and IFN- γ in serum were determined. GC-MS was used to conduct the non-targeted metabolomics study to search the serum and urine related differential metabolites in rats with cold asthma, and MetaboAnalyst was used to construct related metabolic pathways. **Results** The results showed that Linggan Wuwei (fresh/dry/stir-frying) Jiangxin Decoction improved the pathological changes of rat lung tissue, significantly reduced the BALF inflammatory cell count in BALF and IgE and IL-4 levels in serum, and increased IFN- γ levels. Compared with the

收稿日期: 2019-07-19

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1708085MH196); 国家重点研发计划资助项目(RD19100084)

作者简介: 姚梦雪(1992—), 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与质量控制。E-mail: 15755167225@163.com

*通信作者 韩燕全, 博士, 主任中药师, 研究方向为中药炮制与质量控制。E-mail: hyquan2003@163.com

洪 燕, 副教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: 591940167@qq.com

control group, 37 differential metabolites (15 in serum and 22 in urine) were screened in cold asthma rats. And seven metabolic pathways involving energy metabolism, oxidative stress may be associated with cold asthma by Metaboanalysis pathway analysis. The overall metabolic profile of the cold asthma rats with the intervention of Linggan Wuwei (fresh/dry/stir-frying) Jiangxin Decoction tended to normal levels. The effect of Linggan Wuwei (dry) Jiangxin Decoction on cold asthma was better than Linggan Wuwei (fresh/stir-frying) Jiangxin Decoction. **Conclusion** It is more reasonable to process ginger into dried ginger in Linggan Wuwei Jiangxin Decoction against cold asthma. Ginger processing-compatibility may play a therapeutic role in cold asthma rats by regulating energy metabolism and oxidative stress.

Key words: ginger; GC-MS; metabonomics; cold asthma; processing-compatibility; Linggan Wuwei (fresh/dried/stir-frying) Jiangxin Decoction

中药炮制和复方配伍是中医临床用药的两大特色。姜是临床常用中药, 常见炮制品有生姜、干姜、炮姜等, 前人对姜炮制品有“生姜走而不守, 干姜能走能守, 炮姜守而不走”的精辟概述, 课题组前期研究亦表明姜的不同炮制品中姜酚类成分及药效作用不同^[1-2]。中医临床多以复方用药, 在复方中研究炮制更为符合临床实际。苓甘五味姜辛汤, 出自《金匱要略》, 是临床上治疗寒饮伏肺哮喘的经典方剂, 该方所选姜为干姜, 且以之为君药, 具有温中散寒、温肺化饮之功效^[3]。课题组前期研究表明姜炮制前后对苓甘五味姜辛汤化学成分影响明显^[1], 为了更全面、更系统地揭示姜炮制机制, 本实验将姜的不同炮制品纳入苓甘五味姜辛汤复方中进行代谢组学研究。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 能够比较全面地揭示药物治疗疾病过程中生物体系内所发生的变化, 该方法强调将人体作为一个完整系统来研究, 与中医整体观一致, 可为中药炮制配伍理论的探讨提供新的研究思路和强大的技术支持^[4-5]。气相色谱-质谱 (GC-MS) 仪是代谢组学常用分析平台, 具有高灵敏度、高分离效率、成本低、大量可用数据库等优点, 并且由于其高标准化地应用了电子电离, 能产生广泛和高重复性的破裂片段, 在代谢组学应用中相对成熟^[6-7]。故本实验在前期研究的基础上, 建立寒饮伏肺哮喘大鼠模型, 以苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤为研究对象, 利用 GC-MS 代谢组学技术, 研究姜炮制-配伍对寒饮伏肺哮喘大鼠血清、尿液代谢物的影响, 从代谢组学角度阐明姜炮制-配伍的作用机制, 以期为临床合理选用炮制品及炮制-配伍机制研究提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

SCION 456-GC 型气相色谱-质谱联用仪, 美国 Bruker 公司, 配备美国 Bruker 公司的 CP-8400 自动

进样器, 质谱检索数据库 NIST 11.0 L; JM-A20001 电子天平 (余姚纪铭称重校验设备有限公司); 1611011671 压缩雾化器 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); KDC-16H 离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司), KQ3200DB 超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); RM2135 旋转式切片机 (德国莱卡公司)。

1.2 药品与试剂

卵清白蛋白 (OVA, Sigma 公司); 瑞士-姬姆萨染色液 (南昌雨露实验器材有限公司); *N,O*-双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺 (BSTFA) -含 1% 三甲基氯硅烷 (TCMS)、甲氧铵盐酸盐、吡啶均购自西亚试剂公司; 尿素酶 (批号 EK170062) 购自上海伊卡生物技术有限公司; 血清中免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素-4 (IL-4)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 测定试剂盒均购于安迪华泰生物技术有限公司; 甲醇 (批号 20170905)、三氯甲烷 (批号 20170321) 均购自国药化学试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。

苓甘五味姜辛汤组方药材干姜、茯苓、甘草、五味子、细辛均购自安徽中医药大学第一附属医院中药房, 经安徽中医药大学李立华主任中药师鉴定, 均符合《中国药典》2015 年版规定, 为正品药材, 其中干姜和炮姜均为同批生姜按照《中国药典》2015 年版方法炮制得到。桂龙咳喘宁胶囊 (批号 Z20053135), 购于桂龙药业有限公司。

1.3 动物

SD 雄性大鼠 48 只, 体质量 (200±20) g, 购自安徽医科大学, 实验动物生产许可证号 SCXK (皖) 2016-0002。动物饲养在室温 15~22 °C、相对湿度 40%~60% 的环境下, 实验严格遵守国家科学技术委员会颁发的“实验动物管理条例”的相关规定操作。

2 方法

2.1 苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤水煎液的制备

按照《金匱要略》组方配伍, 苓甘五味姜辛汤

由干姜 9 g、茯苓 12 g、甘草 9 g、五味子 5 g、细辛 5 g 组成。根据前期优化的最佳煎煮工艺,所需药材 12 倍量水浸泡 40 min,武火煮沸后,文火保持微沸 40 min,滤过,药渣加 8 倍量水同法煎煮,滤过,合并 2 次滤液,浓缩至含生药 2.2 g/mL 的苓甘五味(干)姜辛汤水煎液^[8]。将组方中干姜分别替换成等量生姜、炮姜,重复以上制备过程,分别得到苓甘五味(生/炮)姜辛汤水煎液。UPLC 法测定苓甘五味(干)姜辛汤水煎液主要化学成分质量分数分别为甘草苷 0.059 7 mg/g、甘草酸单铵盐 0.152 5 mg/g、6-姜酚 0.003 7 mg/g、细辛脂素 0.009 4 mg/g、五味子醇甲 0.003 7 mg/g^[8]。此外,苓甘五味(生/炮)姜辛汤水煎液主要化学成分质量分数分别为甘草苷 0.048 2、0.048 2 mg/g,甘草酸单铵盐 0.122 2、0.181 1 mg/g,6-姜酚 0.000 8、0.003 9 mg/g,细辛脂素 0.007 5、0.010 2 mg/g,五味子醇甲 0.003 9、0.005 0 mg/g

2.2 寒饮伏肺哮喘大鼠模型的制备及给药

大鼠适应性饲养 1 周,随机分为对照组、模型组、苓甘五味(生)姜辛汤组(SJF)、苓甘五味(干)姜辛汤组(GJF)、苓甘五味(炮)姜辛汤组(PJF)及阳性药桂龙咳喘宁组(PC),共 6 组,每组 8 只。依照参考文献方法^[9],除对照组外,其余各组大鼠在第 1、8 天均 ip 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),每毫升 PBS 中含 100 mg OVA+100 mg 氢氧化铝混合溶液,第 15 天起雾化吸入含 1% OVA 的 PBS 溶液激发,每次 30 min,激发后立即置于(14±2)℃冰水中游泳 30 min,连续 15 d,激发期间给予冷水及冰冻饮食,制备寒饮伏肺哮喘模型。且各给药组大鼠分别从激发当天起 ig 苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤水煎液 21.6 g/kg(按照大鼠与人的体表面积折算后的 6 倍量及前期预试验结果确定),依照同等剂量换算,PC 组 ig 阳性药桂龙咳喘宁 2.43 g/kg,各组均连续给药 30 d,对照组 ig 同等剂量生理盐水。

以大鼠一般形态、肺组织病理学 HE 染色、肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞计数,血清中 IgE、IL-4、IFN- γ 为检测指标,评估大鼠模型是否成功。

2.3 大鼠样本收集与处理

2.3.1 血清样本收集与处理 实验第 45 天,2%戊巴比妥(50 mg/kg) ip 麻醉大鼠,腹主动脉取血,冰上放置 3 h,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,置于-80℃冰箱中待测。依据文献方法^[2],取-80℃冰箱保存的血清样品,室温下解冻,取 100 μ L 血清至 2 mL EP 管,加入 350 μ L 甲醇,12 000 r/min 离

心 10 min,取 350 μ L 上清液于 2 mL GC-MS 进样瓶中室温下氮气吹干;后加入 80 μ L 甲氧胺盐试剂(溶于 20 mg/mL 吡啶),轻轻混匀后,37℃孵育 2 h;迅速向每个样品中加入 100 μ L BSTFA(含有 1% TCMS),70℃孵育 1 h,冷却至室温,上机检测。

2.3.2 尿液样本收集与处理 实验第 44 天,将各组大鼠置于代谢笼中,正常饮水(禁食),收集 24 h 尿液(加 1%叠氮化钠),3 000 r/min 离心 10 min,取上清,置于-80℃冰箱中待测。取-80℃冰箱保存的尿液样品,室温下解冻,取尿液 100 μ L 至 2 mL EP 管,加 10 μ L 尿素酶(20 mg/mL)37℃孵育 1 h,再加入 350 μ L 甲醇-氯仿(3:1),12 000 r/min 离心 10 min,取 350 μ L 上清,其余处理同血清。

2.3.3 BALF、肺组织收集 末次给药后,麻醉大鼠,支气管插管,用 5 mL 注射器向气管内缓慢注入 3 mL 37℃、0.9%氯化钠溶液,迅速回抽灌洗,反复 3 次(每次约有 70%回收量),3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留沉淀,4℃保存,待测。获取大鼠 BALF 后,切除大鼠右上肺中叶,固定在 10%中性福尔马林中,待测。

2.4 GC-MS 条件

2.4.1 色谱条件 BR-17 型石英毛细管色谱柱(250 μ m×0.25 μ m×30 m),载气为高纯氦气,体积流量为 1 mL/min,分流模式(分流比为 20:1),进样量为 1 μ L,程序升温条件:初始温度为 50℃,以 8℃/min 升温至 100℃(保持 2 min),再以 4℃/min、8℃/min 交替升温至 120、180、200、250℃,最终至 280℃(保持 2 min)。

2.4.2 质谱条件 EI 电离,碰撞能量为 70 eV;离子源和接口温度分别为 219、279℃,四级杆温度为 40℃,全扫描模式,扫描范围为 m/z 50~500。

2.5 数据分析和统计

所得到的 GC-MS 原始数据由 Proteowizard(<http://proteowizard.sourceforge.net/download.html>)转换成 net.cdf 格式。利用 XCMS 在线处理软件(<https://xcmsonline.scripps.edu>)对采集到的谱图进行峰提取,峰识别、峰对齐、峰过滤等操作,得到一个包括保留时间、质荷比、峰面积的数据集,经 Excel 归一化处理后导入到 SIMCA 13.0(Umetrics AB, Umea, Sweden)软件,对其进行多变量统计分析,根据变量重要投影(variable importance projection, VIP)>1 筛选差异代谢物。并利用 SPSS 23.0 统计学软件进行 t 检验, $P<0.05$ 有显著差异。NIST 数据库进行物

质鉴定 (Match > 700), 选取 VIP > 1、P < 0.05、Match > 700 筛选所得的交集作为差异代谢物。MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 构建代谢通路。药效数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果与分析

3.1 模型评价及药效作用

3.1.1 一般形态学观察 对照组大鼠活动自如, 皮毛光洁, 呼吸平稳, 模型组大鼠在雾化激发数次后行动迟缓, 挠鼻次数增加, 打喷嚏, 呼吸急促, 部分大鼠有哮鸣音, 且爪肿胀, 口唇发白, 毛发晦暗。与模型组相比, 各给药组大鼠症状减轻, 挠鼻次数减少, 精神状态好转, 且 PC、GJF、PJF 组大鼠呼吸困难的明显减轻。

3.1.2 大鼠肺组织 HE 染色 如图 1 所示, 模型组大鼠肺组织 HE 染色后, 出现明显的病理改变: 支

气管壁增厚, 支气管周围炎性细胞浸润, 管腔狭窄且有黏液栓形成。经各药物治疗后, 上述肺组织病理有所改善: 支气管壁变薄, 支气管周围炎性细胞浸润减少, 尤以 PC、GJF 组更为明显; 管腔空隙狭窄改善, 尤以 PJF 组更为明显, 且各给药组未见明显黏液栓。

3.1.3 BALF 炎性细胞计数及血清中 IgE、IL-4、IFN- γ 的检测结果 对各组大鼠 BALF 中细胞计数及血清中炎性细胞因子 IgE、IL-4、IFN- γ 检测, 结果见表 1。与对照组相比, 模型组大鼠 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞数、单核巨噬细胞数、中性粒细胞数显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清中 IgE、IL-4 水平升高 ($P < 0.01$), IFN- γ 水平降低 ($P < 0.01$); 经各药物治疗后, BALF 细胞计数及血清 IgE、IL-4、IFN- γ 水平均出现向对照组回调趋势, 且 PC、GJF 组回调更为明显 ($P < 0.01$)。

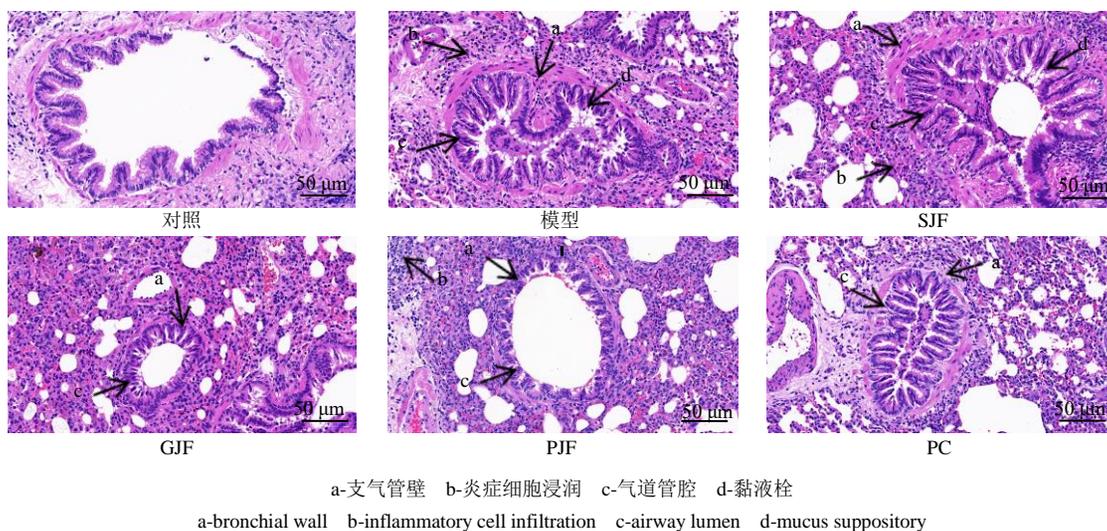


图 1 HE 染色观察各组大鼠肺组织病理学变化 (×200)

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue of rats in each group observed by HE staining (×200)

表 1 各组大鼠 BALF 细胞计数及血清 IgE、IL-4、IFN- γ 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Cell counting of BALF and levels of IgE, IL-4, and IFN- γ in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	BALF 细胞计数				血清炎症因子		
	总细胞/($\times 10^6$)	嗜酸性粒细胞/%	单核巨噬细胞/%	中性粒细胞/%	IgE/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-4/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	IFN- γ /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	2.21 ± 0.45	1.06 ± 0.35	12.50 ± 0.64	11.25 ± 0.53	100.00 ± 3.80	250.40 ± 5.73	1 316.00 ± 15.16
模型	28.45 ± 1.14 [#]	30.44 ± 1.37 ^{##}	62.88 ± 0.81 ^{##}	25.31 ± 1.16 ^{##}	296.30 ± 7.16 ^{##}	913.00 ± 33.84 ^{##}	494.20 ± 19.22 ^{##}
SJF	6.25 ± 0.55 ^{**}	27.13 ± 1.31 ^{**}	36.88 ± 0.42 ^{**}	22.38 ± 0.63 [*]	214.00 ± 9.48 ^{**}	546.50 ± 14.59 ^{**}	1 092.00 ± 39.22 ^{**}
GJF	3.50 ± 0.40 ^{**}	9.38 ± 0.43 ^{**}	45.81 ± 0.80 ^{**}	13.88 ± 0.91 ^{**}	174.40 ± 4.85 ^{**}	476.60 ± 7.55 ^{**}	821.10 ± 24.36 ^{**}
PJF	3.90 ± 0.44 ^{**}	17.38 ± 0.47 ^{**}	39.13 ± 0.81 ^{**}	16.56 ± 0.65 ^{**}	247.20 ± 3.72 ^{**}	559.40 ± 14.57 ^{**}	736.80 ± 33.46 ^{**}
PC	2.82 ± 0.30 ^{**}	5.63 ± 0.43 ^{**}	49.80 ± 0.95 ^{**}	19.88 ± 0.94 ^{**}	105.34 ± 4.42 ^{**}	350.56 ± 8.52 ^{**}	1 034.23 ± 12.30 ^{**}

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

3.2 代谢组学分析

3.2.1 寒饮伏肺哮喘模型大鼠血清、尿液代谢轮廓分析 首先采用主成分分析 (PCA) 无监督模式识别分析方法对血清、尿液样本间差异进行直观显示。如图 2 所示, 在 PCA 模型中, 模型组大鼠血清、尿液样本与对照组有一定的区分, 为了使样本达到最大化分离, 紧接着建立有监督模式识别方法偏最小

二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 模型, 并在建立的 PLS-DA 模型下进行随机置换检验 ($n=200$) 及模型的解释率 (R^2_Y), 预测能力 (Q^2) 等参数进行评估, 结果排列实验得到的 $R^2=0.472$, $Q^2=-0.185$ (血清, 图 2); $R^2=0.571$, $Q^2=-0.0053$ (尿液, 图 2)。结果均表明模型稳定性、预测能力较好, 模型未出现过拟合。

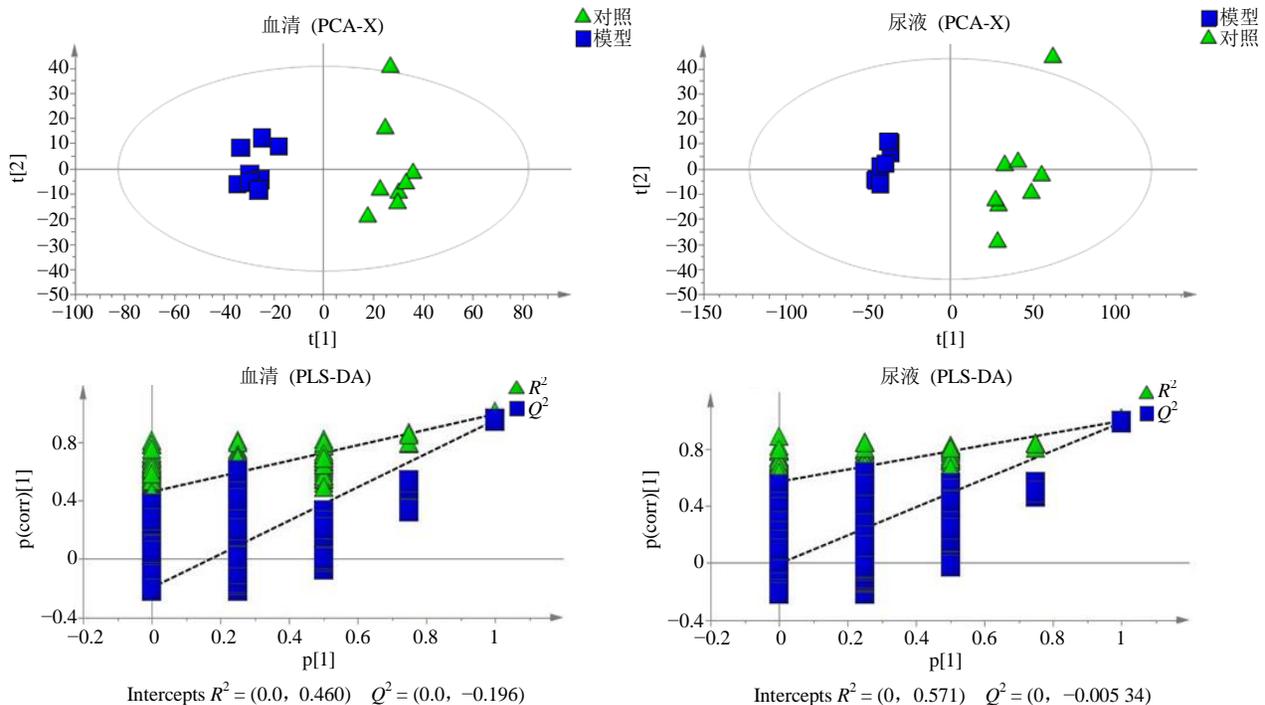


图 2 对照组、模型组大鼠血清、尿液样本的多元数据分析

Fig. 2 Multivariate data analysis plot of serum and urine in control group compared with model group

3.2.2 差异性代谢物的鉴定 在 OPLS-DA 模型下筛选差异性代谢物, 作得分图及载荷图, 寻找贡献值较大的变量 (图 3)。同时结合 $VIP>1$ 及 $P<0.05$ 作为筛选标准, 将相应的保留时间和特征质荷比与 NIST 库比对, $Match>700$, 共筛选出 37 种差异性代谢物 (血清 15 个、尿液 22 个), 结果见表 2。与对照组比较, 模型组有 9 个代谢物上调, 血清中 4 个分别为乳酸、十七烷、*D*-(-)-塔罗糖、软脂酸水平上调; 尿液中 5 个分别为苯甲酸、丁二酸、己二酸、 β -*D*-吡喃葡萄糖、柠檬酸水平上调; 模型组有 28 个代谢物下调, 血清中 11 个分别为甘油、甘氨酸、磷酸 (3:1)、*D*-松醇、*D*-甘露醇、*D*-半乳糖、*D*-葡萄糖、吡喃葡萄糖、肌醇、硬脂酸、乳糖水平下调; 尿液中 17 个分别为磷酸 (3:1)、3,4-二羟基丁酸、*L*-苏糖酸、*D*-(+)-阿拉伯醇、*L*-果糖、戊二

酸、核糖酸、苯乙酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、葡萄糖二酸、肌醇、*L*-抗坏血酸、 β -葡萄糖苷酸、*D*-乳糖、麦芽糖、*D*-(+)-纤维二糖水平下调。

3.2.3 苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤对寒饮伏肺哮喘大鼠血清和尿液代谢的干预作用 为了最大化可视各组间的差异, 采用 OPLS-DA 对各组间代谢谱进行分型, 3D 得分图结果见图 4, 模型组与对照组显著分离, 苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤干预后, 大鼠血清、尿液代谢轮廓趋向对照组方向转变。并分别对模型组与苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤各组大鼠血清及尿液样本进行两两比较, 确定苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤对寒饮伏肺哮喘大鼠血清及尿液代谢物的干预作用, 具体调节趋势见表 2。根据各组大鼠血清、尿液差异性代谢物峰面积及变化趋势绘制箱式图, 见图 5 和 6。可见, 除了甘油、葡萄糖苷酸、

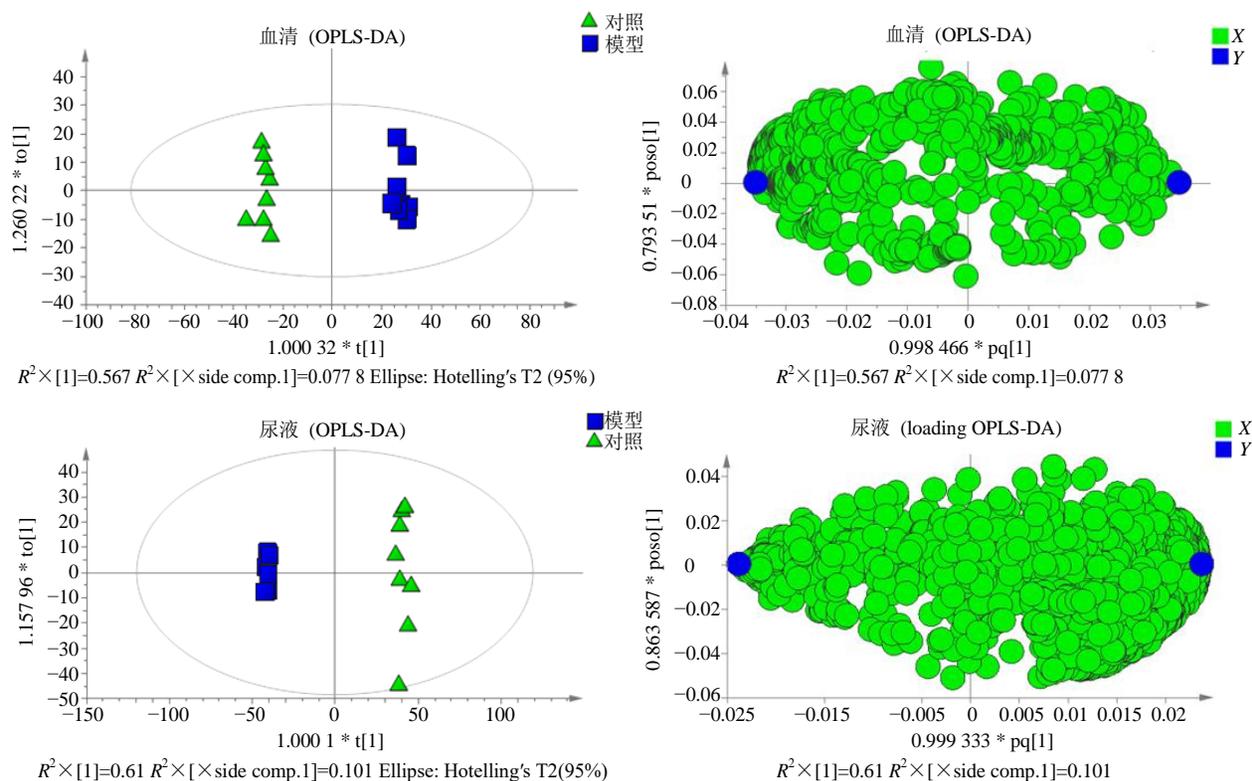


图 3 对照组、模型组大鼠 OPLS-DA 得分图及载荷图

Fig. 3 OPLS-DA score and loading of control and model group

表 2 寒饮伏肺哮喘大鼠血清、尿液差异性代谢物及苓甘五味 (生/干/炮) 姜辛汤的干预调节

Table 2 Differential metabolites of serum and urine in cold asthma rats and intervention of Linggan Wuwei (fresh/dry/stir-frying) Jiangxin Decoction

编号	t_R /min	差异性代谢物	m/z	VIP	P	Match	组间变化			
							模型 vs 对照	SJF vs 模型	GJF vs 模型	PJF vs 模型
Sm1	5.333	乳酸	28, 45, 73, 88, 117, 147, 191, 219	1.23	0.00	953	↑	—	↓	↓
Sm2	8.449	甘油	73, 103, 133, 147, 177, 205, 218	1.01	0.01	881	↓	↑	—	↑
Sm3	9.889	甘氨酸	45, 73, 86, 133, 147, 174, 188, 248, 276	1.72	0.02	824	↓	—	↑	↑
Sm4	11.115	磷酸 (3:1)	73, 133, 211, 253, 283, 299, 314	1.43	0.01	776	↓	—	↑	↑
Sm5	19.798	十七烷	57, 71, 85, 99, 127, 155, 238	1.16	0.00	792	↑	↓	↓	↑
Sm6	22.088	D-松醇	73, 147, 159, 247, 260, 318, 433	1.61	0.03	867	↓	—	↑	—
Sm7	22.490	D-(-)-塔罗糖	15, 45, 73, 103, 133, 147, 189, 217, 307, 466	1.96	0.00	874	↑	—	↑	—
Sm8	22.634	甘露醇	73, 103, 147, 205, 217, 319, 345	1.18	0.00	858	↓	—	↑	—
Sm9	22.853	D-半乳糖	45, 59, 73, 103, 129, 147, 160, 205, 217, 229, 291, 319	1.26	0.00	922	↓	↑	↑	—
Sm10	23.069	D-葡萄糖	73, 103, 147, 205, 268, 319	1.40	0.01	922	↓	↑	↑	↑
Sm11	24.363	吡喃葡萄糖	73, 103, 129, 147, 191, 204, 217, 231	1.16	0.00	834	↓	↑	↑	↑
Sm12	25.131	肌醇	73, 103, 129, 147, 217, 305, 343, 432	1.14	0.00	891	↓	↑	↑	↑
Sm13	27.786	软脂酸	73, 83, 117, 132, 145, 159, 201, 243, 269, 313, 328	1.07	0.00	899	↑	↓	↓	—
Sm14	32.181	硬脂酸	43, 55, 73, 117, 132, 145, 201, 243, 269, 341, 356	1.13	0.00	887	↓	↑	↑	—

续表 2

编号	t_R /min	差异代谢物	m/z	VIP	P	Match	组间变化			
							模型 vs 对照	SJF vs 模型	GJF vs 模型	PJF vs 模型
Sm15	38.921	乳糖	73, 89, 103, 147, 204, 243, 271, 319	1.25	0.00	895	↓	—	↑	—
Um1	10.938	磷酸 (3:1)	73, 115, 133, 211, 283, 299, 314	1.04	0.00	938	↓	↓	↑	—
Um2	12.122, 7.151	苯甲酸	77, 105, 117, 147, 179, 194	1.08	0.00	923	↑	↓	↓	↓
Um3	12.932	丁二酸	73, 129, 147, 172, 247	1.16	0.00	935	↑	↓	↓	↓
Um4	14.120	3,4-二羟基丁酸	73, 147, 189, 233, 246, 300	1.22	0.00	914	↓	—	↑	—
Um5	16.996	L-苏糖酸	73, 117, 147, 205, 292, 409	1.01	0.03	920	↓	↓	↑	↓
Um6	19.630	D-(+)-阿拉伯醇	73, 103, 147, 205, 217, 243, 307, 395	1.08	0.00	913	↓	↓	↑	—
Um7	20.367, 20.509, 1.292	L-(-)-果糖	73, 89, 117, 133, 147, 201, 231	1.02	0.04	867	↓	↓	↑	↑
Um8	21.160	戊二酸	73, 112, 147, 186, 198, 229, 260, 288	1.06	0.00	850	↓	↓	↑	↑
Um9	21.292	己二酸	73, 109, 129, 147, 203, 233, 247, 363	1.21	0.00	774	↑	↓	—	—
Um10	21.406	核糖酸	73, 103, 147, 217, 292, 307	1.09	0.002	909	↓	↓	↑	↑
Um11	21.814	苯乙酸	73, 89, 105, 147, 164, 179, 252, 281	1.08	0.01	878	↓	—	↑	↑
Um12	22.380	β -D-吡喃葡萄糖	73, 147, 191, 204, 291, 345, 435	1.42	0.00	928	↑	↑	↑	↑
Um13	22.853	D-葡萄糖	73, 103, 147, 160, 205, 217, 319	1.01	0.00	923	↓	↓	↑	—
Um14	22.862	D-半乳糖	73, 147, 160, 205, 217, 229, 291, 319	1.18	0.00	930	↓	↓	↑	—
Um15	23.420	柠檬酸	73, 147, 183, 211, 231, 273, 285, 363	1.01	0.00	910	↑	↓	↓	—
Um16	23.958	葡萄糖二酸	73, 103, 147, 292, 333, 423	1.00	0.01	708	↓	↓	↑	—
Um17	25.138	肌醇	73, 103, 147, 265, 305, 367, 432	1.01	0.01	879	↓	↓	↑	—
Um18	25.523	L-抗坏血酸	73, 133, 147, 205, 243, 274, 361, 391	1.08	0.04	800	↓	↓	↑	—
Um19	38.591	β -葡萄糖苷酸	73, 103, 147, 180, 257, 375	1.07	0.00	923	↓	—	—	—
Um20	38.821	D-乳糖	73, 103, 129, 147, 204, 217, 319, 361	1.15	0.00	928	↓	↓	↑	↑
Um21	39.434	麦芽糖	73, 147, 204, 217, 361, 373, 392	1.19	0.00	824	↓	—	↑	↑
Um22	40.406	D-(+)-纤维二糖	73, 103, 147, 191, 204, 217, 243, 361	1.17	0.00	928	↓	—	—	—

↑表示上调；↓表示下调；—表示无显著性差异

↑ represents up-regulation; ↓ represents down-regulation; — represents no significant difference

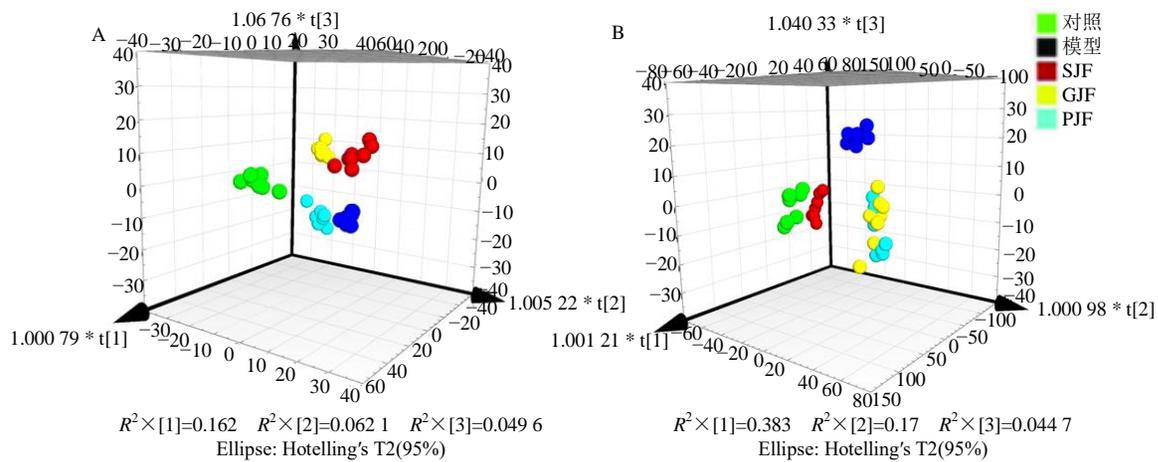
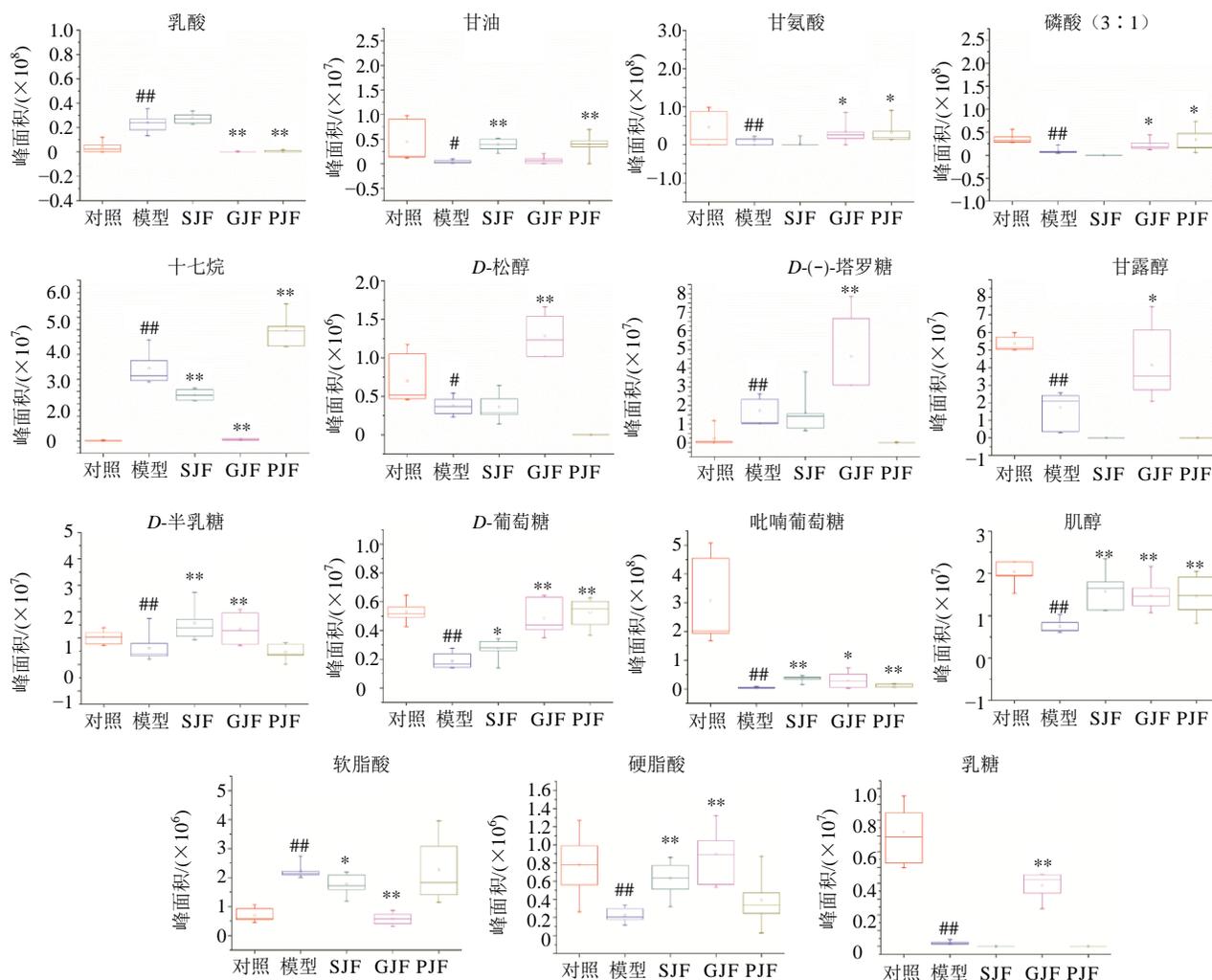


图 4 各组大鼠血清 (A)、尿液 (B) OPLS-DA 得分 3D 图

Fig. 4 3D plot of OPLS-DA of serum (A) and urine (B) of rats in each group



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
 $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 5 各组大鼠血清差异性代谢物箱式图 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Box plot of differential metabolites of serum in cold asthma rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

己二酸、*D*-(+)-纤维二糖外，苓甘五味（干）姜辛汤对多数与寒饮伏肺哮喘相关代谢物有调节作用。

3.2.4 代谢通路分析 为了寻找与寒饮伏肺哮喘相关的代谢通路，将筛选到的差异性代谢物（表 2）输入到 Metabo Analyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 中进行通路分析，结果如图 7 所示，主要涉及 7 条代谢通路：淀粉和蔗糖代谢，半乳糖代谢，柠檬酸代谢，乙醛酸二羧酸代谢，甘油磷脂代谢，甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢，肌醇磷酸代谢。其中淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、柠檬酸代谢、乙醛酸二羧酸代谢均与能量代谢有关；甘油磷脂代谢，甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢，肌醇磷酸代谢则与氧化应激有着密切关系。苓甘五味（生/干/

炮）姜辛汤可能通过调节与此相关的代谢通路，发挥治疗寒饮伏肺哮喘的作用。

3.2.5 代谢物与药效指标相关性分析 经 Pearson 偏最小二乘回归分析，寒饮伏肺哮喘大鼠血清、尿液差异代谢物与药效指标关系密切，后经相关性热图呈现，如图 8 所示。血清、尿液差异代谢物与药效指标相关系数见表 3，结果可见，代谢物 Sm1、Sm5（乳酸、十七烷），代谢物 Um3（丁二酸）与药效指标 IgE、IL-4、嗜酸性粒细胞（Eso）、单核巨噬细胞（Mon）、中性粒细胞（Neu）呈显著正相关，其中十七烷、丁二酸与 IFN- γ 呈显著负相关。代谢物 Sm15（乳糖）、代谢物 Um13（*D*-葡萄糖）、Um14（*D*-半乳糖）、Um18（抗坏血酸）、Um19（ β -葡萄糖

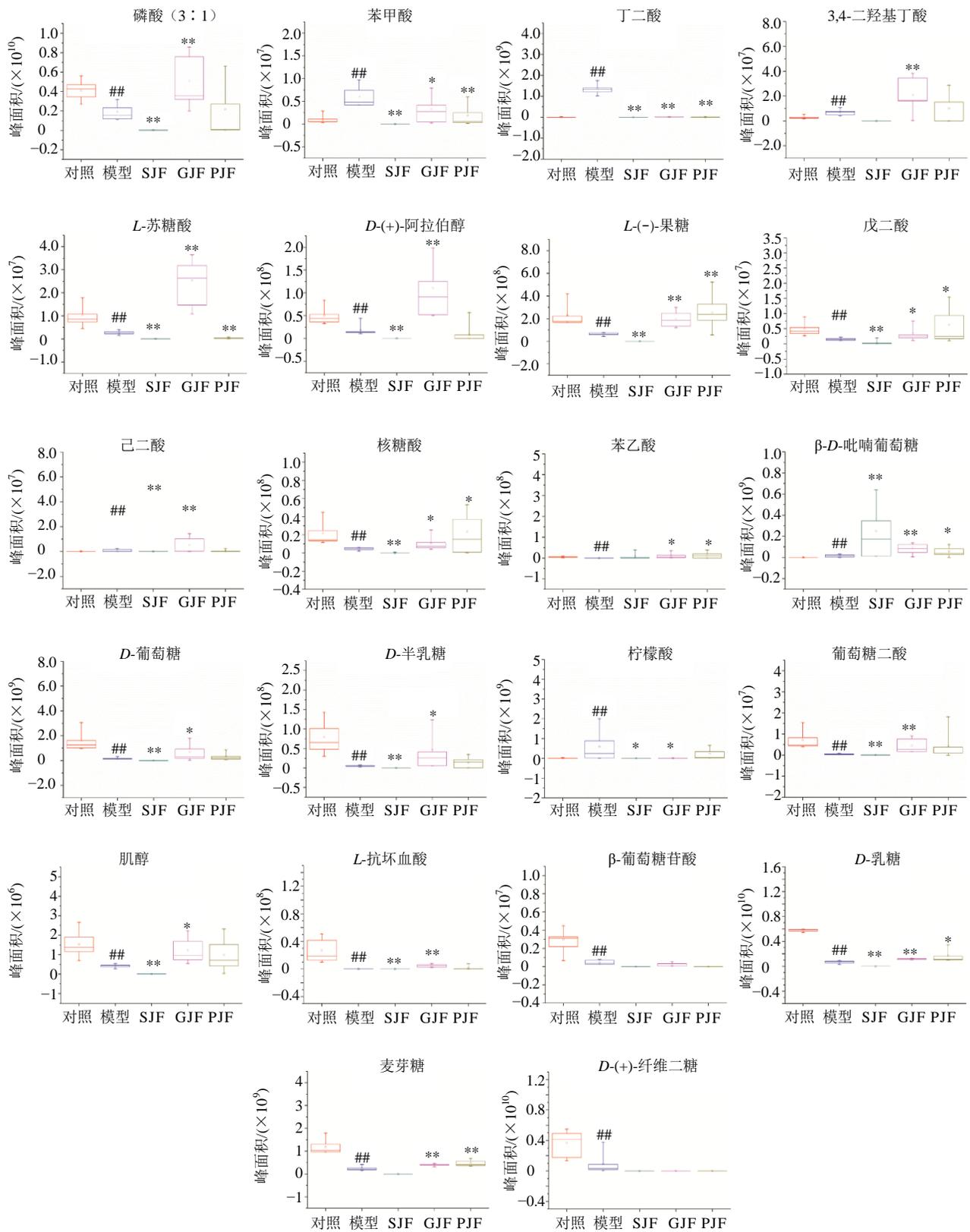


图 6 各组大鼠尿液差异性代谢物箱式图 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Box plot of differential metabolites of urine in cold asthma rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

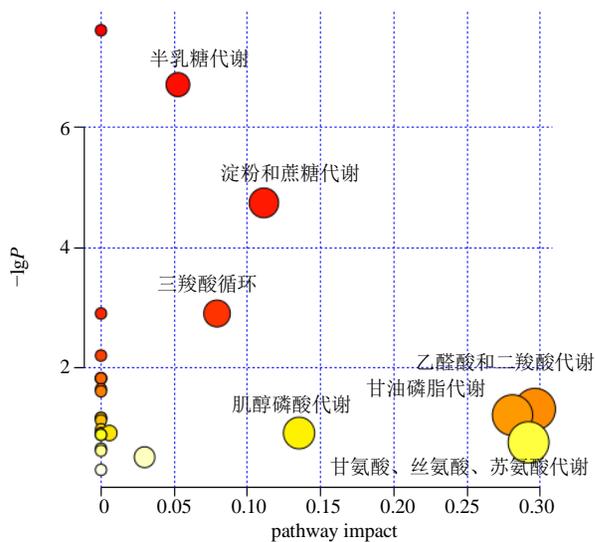


图 7 代谢通路分析

Fig. 7 Metabolic pathway analysis

昔酸)、Um20 (*D*-乳糖)、Um21 (麦芽糖)、Um22 [*D*-(+)-纤维二糖]与药效指标 IgE、IL-4、Eso、Mon、Neu 呈显著负相关, 与 IFN- γ 呈显著正相关。

4 讨论

代谢组学作为一门新兴的学科, 在多种领域展示了其广阔的应用前景。将代谢组学应用到中药炮制-配伍研究中, 更符合中药多组分、多靶点、整合调节的作用特点及中医药理论的整体观、动态观、辨证观^[10-12]。通过研究炮制-配伍前后机体内源性代谢物的变化, 寻找中药炮制-配伍治疗疾病的可能作用机制。GC-MS 技术常多采用程序升温法, 用于挥发性、极性弱的成分检测, 对于极性强的物质需要进行衍生化处理后才能进样。本实验采用最常见的甲基硅烷衍生化技术, 使用 BSTFA (含 1% TCMS) 作为衍生化试剂, 同时在衍生化处理过程中考察了烘箱加热法及氮吹法对衍生化效果的影响, 结果发

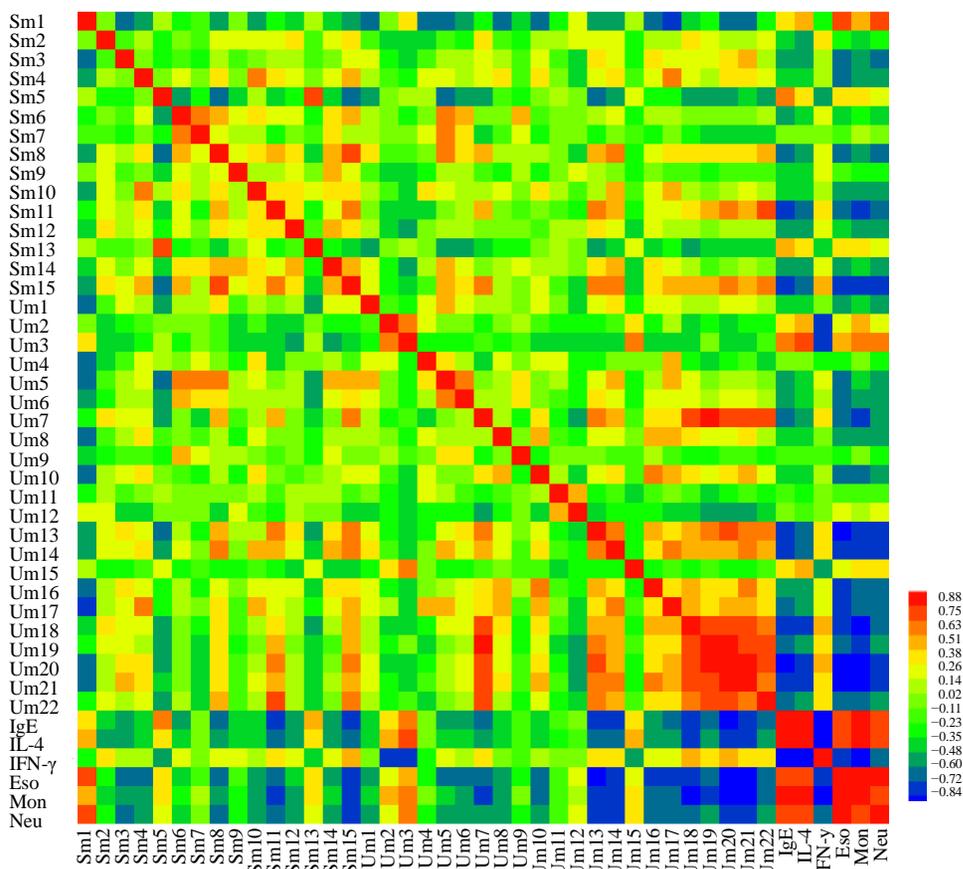


图 8 大鼠血清、尿液代谢物与药效指标相关性热图

Fig. 8 Correlation map of rat serum and urine metabolites and pharmacodynamics indexes

现氮吹法取得了良好的衍生效果。

本实验结果显示, 大鼠造模后, 其血清及尿液代谢物谱发生了明显变化。37 种代谢物发生了显著

改变, 且这些糖类、氨基酸、脂肪酸类物质主要与能量代谢、氧化应激存在联系。糖类物质在无氧条件下通过糖酵解产生乳酸提供能量, 在有氧条件下

表 3 大鼠血清、尿液代谢物与药效指标显著相关性系数

Table 3 Correlation coefficient of rat serum and urine metabolites and pharmacodynamics indexes

代谢物	相关关系	相关系数					
		IgE	IL-4	IFN- γ	Eso	Mon	Neu
Sm1 (乳酸)	正相关	0.466**	0.523**	—	0.769**	0.616**	0.750**
Sm5 (十七烷)		0.634**	0.451**	-0.471**	0.500**	0.427*	0.378*
Um3 (琥珀酸)		0.637**	0.823**	-0.682**	0.596**	0.710**	0.646**
Sm15 (乳糖)		-0.718**	-0.593**	0.547**	-0.720**	-0.662**	-0.669**
Um13 (D-葡萄糖)		-0.672**	-0.596**	0.426**	-0.723**	-0.715**	-0.636**
Um14 (D-半乳糖)	负相关	-0.668**	-0.582**	0.484**	-0.706**	-0.667**	-0.614**
Um18 (L-抗坏血酸)		-0.677**	-0.606**	0.578**	-0.672**	-0.734**	-0.547**
Um19 (β -葡萄糖苷酸)		-0.601**	-0.458**	0.459**	-0.575**	-0.639**	-0.437**
Um20 (D-乳糖)		-0.727**	-0.687**	0.543**	-0.790**	-0.833**	-0.703**
Um21 (麦芽糖)		-0.651**	-0.631**	0.468**	-0.791**	-0.796**	-0.668**
Um22 [D-(+)-纤维二糖]		-0.521**	-0.445**	0.418**	-0.519**	-0.582**	-0.410**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, - $P > 0.05$

通过糖的有氧氧化（包括柠檬酸循环）产生能量。该实验结果显示，寒饮伏肺哮喘大鼠血清中乳酸水平上升，柠檬酸循环中间产物，柠檬酸、丁二酸（琥珀酸）水平升高，多数糖类物质如乳糖、葡萄糖、半乳糖、麦芽糖及糖的中间产物如阿拉伯醇、甘露醇、葡萄糖酸等水平下降，提示寒饮伏肺哮喘大鼠体内能量代谢出现异常。有研究表明能量代谢产物异常可能是在哮喘的不正常呼吸运动，特别是在缺氧或炎症状态下产生的^[13]。

乳酸是体内碳水化合物和非必需氨基酸在无氧条件下代谢的中间产物，虽然不是产生能量的主要途径，但是具有重要的病理和生理意义。葡萄糖在无氧条件或线粒体损伤时，分解为丙酮酸后在乳酸脱氢酶催化下生成乳酸，机体组织产生的乳酸经由肝脏和肾脏再摄入参与新陈代谢^[14]。在应激或运动状态下，肌肉糖酵解增加，乳酸再摄取减少，体内乳酸含量增加^[15]。在哮喘患儿血清、尿液，哮喘成人血清及肺组织纤维化患者 BALF 中均发现乳酸水平升高^[16-18]。此外，本研究相关性分析结果表明乳酸与炎症细胞具有显著正相关性，与 Ho 等^[19]实验结果一致。柠檬酸、琥珀酸是三羧酸循环代谢中的重要中间产物，本实验结果显示寒饮伏肺哮喘大鼠尿液中柠檬酸、琥珀酸水平均上升。在肺部纤维化呼吸加重期的成人血浆中亦发现柠檬酸水平的升高^[20]，在哮喘患者血清、哮喘患儿尿液中发现琥珀酸水平升高^[21-22]，由此表明这些呼吸系统疾病的能量代谢持

续受损。

甘氨酸，人体非必需氨基酸，除构成蛋白质外，还参与合成多种重要含氮物质，如嘌呤碱、血红素和细胞色素的卟啉环、肌酸、谷胱甘肽及甘氨酸胆碱等^[23]。甘氨酸可抑制活性氧（ROS）生成，减少氧化应激反应的发生^[24]。Heidari 等^[25]发现适量补充甘氨酸可减轻线粒体肿胀，减少 ROS 和脂质过氧化作用。本实验中与对照组相比，模型组大鼠血清中甘氨酸水平下降，苓甘五味（干/炮）姜辛汤干预后，可上调甘氨酸水平。L-抗坏血酸即维生素 C，是一种重要的小分子抗氧化剂，可在空气-肺界面保持抗氧化防御作用^[26]。研究表明维生素 C 对 Treg/Th17 失衡具有调节作用（Treg/Th17 失衡在哮喘发病过程中发挥重要作用）^[27]。另研究表明维生素 C 具有降低组胺的作用（组胺会导致肥大细胞脱颗粒产生一系列的过敏反应），但具体机制不清^[28-29]。在本研究中，与对照组相比，模型组大鼠尿液中维生素 C 水平降低，苓甘五味（干）姜辛汤干预后，可上调维生素 C 水平。D-松醇，有胰岛素样作用，能促进肌酸的吸收，降低血糖^[30]。除此之外，它还具有抗炎、预防心血管疾病等多种作用^[31-32]。Leea 等^[33]研究表明 D-松醇通过抑制 Th2 免疫反应（抑制 GATA-3 和增加 T-bet 的表达）来调节 Th1/Th2 的平衡，减轻 OVA 诱导的过敏性哮喘小鼠的气道炎症和气道高反应性。在本实验中，与对照组相比，模型组血清中 D-松醇水平降低，苓甘五味（干）姜辛汤可上调

D-松醇水平。

综上,本研究基于 GC-MS 代谢组学技术,初步探讨了寒饮伏肺哮喘的可能发病机制及姜炮制-配伍治疗寒饮伏肺哮喘的作用机制。与对照组相比,在寒饮伏肺哮喘大鼠血清及尿液样本中共筛选出 37 种差异性代谢物;结合通路分析,寒饮伏肺哮喘大鼠能量代谢、氧化应激出现异常。苓甘五味(生/干/炮)姜辛汤可能是通过调节能量代谢、氧化应激等达到治疗寒饮伏肺哮喘的作用。且姜炮制-配伍对寒饮伏肺哮喘大鼠血清、尿液代谢标志物影响有显著差异,苓甘五味(干)姜辛汤对寒饮伏肺哮喘大鼠代谢标志物的调节作用强于苓甘五味(生/炮)姜辛汤,这与临床用药相一致。本研究为中药炮制-配伍研究提供参考,为临床合理选用炮制品提供依据。

参考文献

- [1] 冉 珊, 孙方方, 宋 燕, 等. 姜不同炮制品对苓甘五味姜辛汤 4 种成分含量的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(6): 93-96.
- [2] Han Y, Li Y, Wang Y, *et al.* Comparison of fresh, dried and stir-frying gingers in decoction with blood stasis syndrome in rats based on a GC-TOF/MS metabolomics approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 129: 339-349.
- [3] 谢 鸣. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] Fang J W, Wang W Y, Sun S J, *et al.* Metabolomics study of renal fibrosis and intervention effects of total aglycone extracts of *Scutellaria baicalensis* in unilateral ureteral obstruction rats [J]. *Ethnopharmacology*, 2016, 192(4): 20-29.
- [5] Zhao L J, Zhao A H, Chen T L, *et al.* Global and targeted metabolomics evidence of the protective effect of Chinese patent medicine Jinkui Shenqi Pill on adrenal insufficiency after acute glucocorticoid withdrawal in rats [J]. *Proteom Res*, 2016, 15(7): 2327-2336.
- [6] Vinaixa M, Schymanski E L, Neumann S, *et al.* Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2016, 78: 23-35.
- [7] 李 娟, 任路静, 孙冠男, 等. 气相色谱-质谱联用技术及其在代谢组学中的应用 [J]. 生物工程学报, 2013, 29(4): 434-446.
- [8] 孙方方, 冉 珊, 宋 燕, 等. 苓甘五味姜辛汤水煎液工艺的优化 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2192-2196.
- [9] 李 岩. 苓甘五味姜辛汤对寒饮伏肺型哮喘大鼠 cAMP-PKA 通路相关分子表达的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2014.
- [10] 陈志敏, 胡昌江, 郑 午, 等. 代谢组学在中药炮制机制研究中的应用概述 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 275-279.
- [11] 钱文娟, 杨 瑞, 谢 彤, 等. 蒲地蓝消炎口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的 GC-MS 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2258-2264.
- [12] 聂春霞, 何 盼, 郝艳艳, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的山楂不同炮制品对高脂血症大鼠模型的影响研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2362-2370.
- [13] Wolak J E, Esther C R, O'Connell J T M. Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from cystic fibrosis patients [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(1): 55-60.
- [14] 胡宝吉, 薄禄龙, 邓小明, 等. 乳酸酸中毒的相关研究进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(3): 22-24.
- [15] Rodrigo, G J. Serum lactate increase during acute asthma treatment: A new piece of the puzzle [J]. *Chest*, 2014, 145(1): 6-7.
- [16] Yang Q J, Zhang J P, Zhang J H, *et al.* Distinct metabolic profile of inhaled budesonide and salbutamol in asthmatic children during acute exacerbation [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 120(3): 303-311.
- [17] Jung J, Kim S H, Lee H S, *et al.* Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(4): 425-433.
- [18] Alvarez J A, Chong E Y, Walker D I, *et al.* Plasma metabolomics in adults with cystic fibrosis during a pulmonary exacerbation: A pilot randomized study of high-dose vitamin D3 administration [J]. *Metabolism*, 2017, 70: 31-41.
- [19] Ho W E, Xu Y J, Xu F, *et al.* Metabolomics reveals altered metabolic pathways in experimental asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(2): 204-211.
- [20] Peng Jun, St Laurent C D, Befus A D, *et al.* Metabolomic profiling of bronchoalveolar lavage fluids by isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry: A promising approach to studying experimental asthma [J]. *Metabolomics*, 2014, 10(6): 1305-1317.
- [21] Jung J, Kim S H, Lee H S, *et al.* Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(4): 425-433.
- [22] Chang C, Guo Z G, He B, *et al.* Metabolic alterations in the sera of Chinese patients with mild persistent asthma: A GC-MS-based metabolomics analysis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(11): 1356-1366.
- [23] McCarty M F, O'Keefe J H, DiNicolantonio J J, *et al.* Dietary glycine is rate-limiting for glutathione synthesis and may have broad potential for health protection [J]. *Ochsner J*, 2018, 18(1): 81-87.
- [24] Amin F U, Shah S A, Kim M O. Glycine inhibits

- ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain [J]. *Neurochem Int*, 2016, 96(1): 1-12.
- [25] Heidari R, Ghanbarinejad V, Mohammadi H, *et al.* Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of glycine in cholestatic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97(1): 1086-1095.
- [26] Larsson N, Rankin G D, Bicer E M, *et al.* Identification of vitamin C transporters [J]. *BMJ Open*, 2015, 5(4): e006979.
- [27] 李东鞠, 符晓倩, 李 宁, 等. 维生素 C 对 Treg/Th17 失衡的调节作用 [J]. 广西医科大学报, 2018, 35(5): 618-622.
- [28] Hagel A F, Layritz C M, Hagel W H, *et al.* Intravenous infusion of ascorbic acid decreases serum histamine concentrations in patients with allergic and non-allergic diseases [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013, 386(9): 789-793.
- [29] S Romero A, Ely M R, Sieck D C, *et al.* Effect of antioxidants on histamine receptor activation and sustained postexercise vasodilatation in humans [J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(4): 435-449.
- [30] Davis A, Christiansen M, Horowitz J F, *et al.* Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance [J]. *Diabetes Care*, 2000, 23(7): 1000-1005.
- [31] Singh R K, Pandey B L, Tripathi M, *et al.* Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(2): 168-170.
- [32] Kim J I, Kim J C, Kang M J, *et al.* Effects of pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled study [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2005, 59(3): 456-458.
- [33] Leea J S, Leeb C M, Jeong Y I, *et al.* D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(1): 57-64.