

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的补阳还五汤抗慢性炎症大鼠尿液代谢组学研究

尤心怡<sup>1</sup>, 姜丽<sup>1,2\*</sup>, 王文凤<sup>1</sup>, 徐霞<sup>3</sup>, 张寿文<sup>4</sup>, 刘红宁<sup>1</sup>, 严小军<sup>1</sup>, 聂鹏<sup>1</sup>,  
李冰涛<sup>1,2</sup>, 徐国良<sup>1,2\*</sup>

(1. 江西中医药大学 中医基础理论分化发展研究中心 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西南昌 330004; 2. 江西省中药药理学重点实验室, 江西南昌 330004; 3. 山东大学 齐鲁医院 德州医院, 山东德州 253000; 4. 江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 江西南昌 330004)

**[摘要]** 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)探讨补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)对大肠杆菌脂多糖(LPS)诱导的慢性炎症大鼠尿液中内源性标志物的影响,旨在从代谢组学的角度阐述BYHWD治疗慢性炎症的分子作用机制。雄性SD大鼠随机分成正常组、模型组以及BYHWD低、中、高剂量组(7.5、15、30 g·kg<sup>-1</sup>)。模型组及各药物组每周首日尾静脉注射LPS 200 μg·kg<sup>-1</sup>,并于次日灌胃BYHWD,每日1次,连续4周。给药结束收集尿液样品,应用UPLC-Q-TOF-MS分析各组大鼠的尿液代谢轮廓,结合主成分分析(PCA)、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)等多元统计分析方法,分析BYHWD对内源性代谢物的影响;结合单因素方差分析(One-way ANOVA)和变量投影重要度(VIP)筛选出与慢性炎症相关的潜在生物标志物;通过MetaboAnalyst 5.0对鉴定出来的生物标志物进行通路及富集分析。结果显示,在大鼠尿液中筛选和鉴定出25个潜在的生物标志物,与正常组相比,模型组中有14个物质的含量显著上升( $P < 0.05$ ),11个物质的含量显著下降( $P < 0.05$ );BYHWD能够使绝大部分内源性生物标志物呈现良好回调趋势。与模型组比较,BYHWD可显著下调其中的13个生物标志物( $P < 0.05$ ),上调其中的10个生物标志物( $P < 0.05$ )。代谢产物主要与泛酸和辅酶A生物合成、色氨酸代谢、视黄醇代谢、丙酸代谢等代谢通路有关。BYHWD对LPS诱导的慢性炎症具有治疗作用,可能与改善内源性代谢物的水平,提高机体抗炎、抗氧化能力,恢复机体正常代谢活动有关。

**[关键词]** 补阳还五汤;慢性炎症;代谢组学;UPLC-Q-TOF-MS;代谢通路;代谢机制

## Metabolomic study on urine of chronic inflammation rats treated with Buyang Huanwu Decoction based on UPLC-Q-TOF-MS

YOU Xin-yi<sup>1</sup>, JIANG Li<sup>1,2\*</sup>, WANG Wen-feng<sup>1</sup>, XU Xia<sup>3</sup>, ZHANG Shou-wen<sup>4</sup>, LIU Hong-ning<sup>1</sup>, YAN Xiao-jun<sup>1</sup>,  
NIE Peng<sup>1</sup>, LI Bing-tao<sup>1,2</sup>, XU Guo-liang<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Etiopathogenesis, Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine Basic Theory, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;  
2. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine in Jiangxi, Nanchang 330004, China;  
3. Qilu Hospital of Shandong University Dezhou Hospital, Dezhou 253000, China; 4. Research Center for Traditional Chinese Medicine Resources and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[收稿日期]** 2023-03-21

**[基金项目]** 江西省卫生科技计划项目(SKJP\_220210795);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2200956);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD22007);江西省第四批中青年中医药骨干人才计划项目

**[通信作者]** \*姜丽,E-mail:jiangli1009@126.com;\*徐国良,E-mail:xuguoliang6606@126.com

**[作者简介]** 尤心怡,E-mail:2391839646@qq.com

**[ Abstract ]** The study investigated the effect of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on endogenous biomarkers in the urine of rats with chronic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), aiming to elucidate the molecular mechanism underlying the therapeutic effect of BYHWD on chronic inflammation from a metabolomics perspective. Male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, and low-, medium-, and high-dose BYHWD groups (7.5, 15, and 30 g·kg<sup>-1</sup>). The model group and BYHWD groups received tail intravenous injection of LPS (200 μg·kg<sup>-1</sup>) on the first day of each week, followed by oral administration of BYHWD once a day for four consecutive weeks. Urine samples were collected at the end of the administration period, and UPLC-Q-TOF-MS was used to analyze the metabolic profiles of the rat urine in each group. Multivariate statistical analysis methods such as principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the effect of BYHWD on endogenous metabolites. One-way ANOVA and variable importance for the projection (VIP) were used to screen for potential biomarkers related to chronic inflammation. The identified biomarkers were subjected to pathway and enrichment analysis using MetaboAnalyst 5.0. A total of 25 potential biomarkers were screened and identified in the rat urine in this experiment. Compared with the normal group, the model group showed significant increases in the levels of 14 substances ( $P < 0.05$ ) and significant decreases in the levels of 11 substances ( $P < 0.05$ ). BYHWD was able to effectively reverse the trend of most endogenous biomarkers. Compared with the model group, BYHWD significantly down-regulated 13 biomarkers ( $P < 0.05$ ) and up-regulated 10 biomarkers ( $P < 0.05$ ). The metabolic products were mainly related to the biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A, tryptophan metabolism, retinol metabolism, and propionate metabolism. BYHWD has therapeutic effect on chronic inflammation induced by LPS, which may be related to its ability to improve the levels of endogenous metabolites, enhance the body's anti-inflammatory and antioxidant capabilities, and restore normal metabolic activity.

**[ Key words ]** Buyang Huanwu Decoction; chronic inflammation; metabolomics; UPLC-Q-TOF-MS; metabolic pathway; metabolic mechanism

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20230510.401

炎症的本质是机体对致病因素的刺激产生的防御反应,保护人体抵抗病原侵害,然而过度反应的炎症会对细胞功能产生不利影响<sup>[1]</sup>。炎症反应在众多疾病的发病机制中起着关键作用,是各类疾病的中心环节。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)又称为内毒素,是重要的炎症诱导剂<sup>[2-3]</sup>,其侵入机体后,刺激巨噬细胞,释放各类炎性介质,其介导的病理与生理变化在各类疾病的发生、发展过程中扮演重要角色<sup>[4]</sup>。

补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)出自清代王清任《医林改错》,是经典的益气活血方剂,以黄芪补气,再配伍川芎、红花及桃仁等活血药,增强活血化瘀之功,达到气旺则血行,活血而不伤正。对于慢性炎症疾病,临床多使用非甾体类抗炎药或激素类药物进行治疗,但其治疗具有一定的副作用、易反弹复发。中药治疗慢性疾病具有优势,且药理研究<sup>[5-7]</sup>表明,BYHWD可以通过多靶点、多途径干预机体,发挥很好的抗炎作用,疗效明确,副作用少,但机制并不明确。

本课题组前期研究<sup>[8]</sup>发现,造模后,模型组大鼠血浆中的白细胞计数、中性粒细胞百分率和超敏

C反应蛋白(hs-CRP)含量较正常组大鼠显著上升,表明造模成功,并且BYHWD对LPS诱导的模型大鼠疗效明确。在此基础上,为了研究慢性炎症的代谢机制,寻找BYHWD干预慢性炎症的关键生物标志物,本实验利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)分析大鼠尿液中造模及给药前后内源性成分变化,找出差异的潜在生物标志物群,探讨其代谢途径,为阐明BYHWD治疗LPS诱导的炎症性疾病作用机制提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SD大鼠63只,SPF级,雄性,体重(250±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。实验室许可证号SYXK(赣)2017-0004,饲养条件:室内温度(25±4)℃,湿度60%~70%,分笼饲养,每笼3~4只,昼夜自然明暗交替,自由进食和饮水。本实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号20210830001)。

**1.2 仪器** ACQUITY UPLC型超高效液相色谱系统和SYNAPT G2 HDMS型质谱仪(美国Waters公司);KQ-300VDE型超声波清洗机(昆山市超声仪器

有限公司);MS3 型旋涡混合器(德国 IKA);R220SE 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 有限公司);DXL-10 型代谢笼(苏州市冯氏实验动物设备有限公司);MS205DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒托利多公司);Milli-Q 型超纯水净化系统(美国 MilliPore 公司)。

**1.3 药材与试剂** 黄芪、当归尾、赤芍、川芎、红花、桃仁、地龙购自江西华佗国医国药馆,经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心张寿文教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》品种规定。

LPS(批号 L2880)购自美国 Sigma 公司。乙腈、甲醇,色谱级,购自德国默克公司;甲酸(批号 2486917)购自上海迪马科技发展有限公司。

**1.4 补阳还五汤的制备** 取黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 5 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g、地龙 3 g,置于 10 倍水浸泡 30 min 后,加热煮沸,改文火煎煮 60 min,使用纱布过滤后,药渣中再加入 8 倍量的水,再次文火煎煮 60 min,药液过滤后与第 1 次水煎液合并,用旋转蒸发仪将水煎液浓缩至  $2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,等待冷却,置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。将煎煮好的药液作为 BYHWD 给药高剂量组的给药浓度,BYHWD 给药中、低剂量组给药浓度分别为高剂量浓度母液稀释 2 ( $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、4 倍( $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模及给药** 将 63 只大鼠随机分成正常组(12 只)、模型组(15 只)及 BYHWD 低(12 只)、中(12 只)、高(12 只)剂量组。适应性饲养 1 周,从第 2 周开始,模型组以及各给药组每周首日进行尾静脉注射 LPS  $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,正常组注射等量无菌生理盐水;次日各给药组按照相应剂量灌胃给药,正常组、模型组灌胃等体积生理盐水,直至造模结束,共 4 周。BYHWD 低、中、高剂量组灌胃的给药剂量分别为  $7.5$ 、 $15$ 、 $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BYHWD 临床每日剂量为  $143 \text{ g}$ ,以此为中剂量,按大鼠与人剂量进行换算)。

**2.2 样品采集与贮存** 在处死动物前 1 d,将各组大鼠置于代谢笼中,收集药物代谢后 12 h 的大鼠尿液,收集期间所有动物均禁食,自由饮水。尿样置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  离心机中, $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液分装,保存于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱,备用。

**2.3 样品前处理** 参考文献[9],吸取  $350 \mu\text{L}$  尿液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , $13\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取  $300 \mu\text{L}$  上清

液转移至  $1.5 \text{ mL}$  EP 管中,涡旋振荡 10 s;加入  $300 \mu\text{L}$  甲醇-乙腈(2:1),涡旋振荡 1 min;冰水浴中超声提取 10 min; $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  静置 30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , $13\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,将最终所得的上清液通过  $0.22 \mu\text{m}$  有机滤膜后,转移到样品瓶中,进样。各组尿液进样溶液各取  $10 \mu\text{L}$  混合构成质控(quality control, QC)样本。

**2.4 仪器分析条件** 使用 Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $1.7 \text{ mm}\times 100 \text{ mm}$ , $1.7 \mu\text{m}$ ),流动相 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),进样量  $1 \mu\text{L}$ ,柱温  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,样品室温度  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,流速  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。样品梯度洗脱程序见表 1。

表 1 尿液样品梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution programs of urine samples

扫描模式	$t_{\text{R}}/\text{min}$	0.1%甲酸-水/%	乙腈/%
正离子	0	99.0	1.0
	2.00	99.0	1.0
	3.00	88.0	12.0
	16.00	68.0	32.0
	18.00	68.0	32.0
	18.10	99.0	1.0
	20.00	99.0	1.0
负离子	0	99.0	1.0
	2.00	99.0	1.0
	15.00	53.0	47.0
	17.00	53.0	47.0
	17.10	99.0	1.0
	19.00	99.0	1.0

电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,毛细管电压分别为  $3.0$ 、 $2.5 \text{ kV}$ ,锥孔电压均为  $40 \text{ V}$ ,正离子模式下提取锥孔电压  $80 \text{ V}$ ;负离子模式下补偿电压  $80 \text{ V}$ 。电离源温度  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;锥孔气体积流量  $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ;去溶剂气温度  $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;流速  $800 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ;扫描范围  $m/z$   $50\sim 1\ 000$ 。采用甲酸钠对照品进行质量轴标准曲线制作,并利用内参校准液亮氨酸脑啡肽进行实时校正,确保仪器的稳定性和重复性。串联质谱碰撞气为氦气,低碰撞能  $4 \text{ eV}$ ,高碰撞能  $20\sim 40 \text{ eV}$ 。

**2.5 方法学验证** 为了检验系统的稳定性,避免误差,本实验使用 QC 样本进行方法验证。在样品分析前先平衡仪器,连续检测 5 个 QC 样品。在样品分析过程中,每 6 个样品检测后进 1 针 QC 样品,平衡系统。

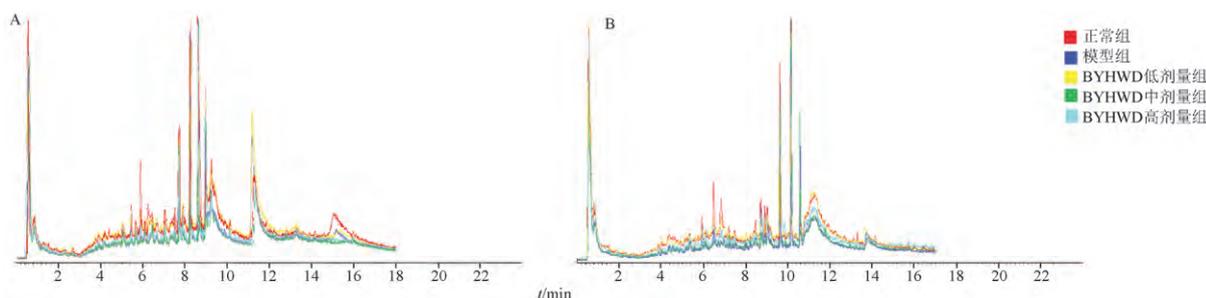
**2.6 代谢组学数据处理、分析及统计** 参考文

献[10-11],通过 MassLynx V4.1 采集样本信息,获得样品总离子流图;导入 Progenesis Q1 软件,设计分组,对采集到的色谱图进行峰提取、峰对齐、峰匹配和峰强度校正等,得到包含化合物保留时间( $t_R$ )、质荷比( $m/z$ )和峰强度信息的数据表。将数据矩阵进行归一化的预处理,使用 SIMCA 14.1 进行主成分分析(PCA)、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)。变量投影重要度(variable importance for the projection, VIP)能够衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力。根据  $VIP > 1$  及采用 GraphPad Prism 9 统计软件对 2 组间进行  $t$  检验( $P < 0.05$ ),筛选差异代谢物。利用 Progenesis Q1 软件在线对 Human Metabolome Database(HMDB)质谱

数据库进行搜索,对于 Progenesis Q1 匹配上的信息,通过 MassLynx 4.1 软件显示该物质二级质谱的离子碎片,再与 HMDB 质谱数据库中相应的质谱信息匹配;对于未匹配上的信息,利用 HMDB(<https://hmdb.ca/>)搜索质荷比,结合加合形式,进行鉴定。对已鉴定的代谢物,其 HMDB ID 上传至 MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>),选择 rat (KEGG)数据库,进行通路分析和富集分析<sup>[12-13]</sup>。

### 3 结果

**3.1 大鼠代谢图谱** 各组大鼠尿液样品的正、负离子模式全扫描总离子流图(TIC)见图 1,可以发现各组尿液样品 TIC 基本相似,但各组峰型及峰面积存在一定差异,表明各组样品代谢物浓度存在一定差异。



A. 正离子模式;B. 负离子模式(图 2~7 同)。BYHWD. 补阳还五汤(图 3、5~7,表 2、3 同)。

图 1 各组大鼠尿液样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of urine samples of rats in each group

**3.2 慢性炎症大鼠及其给药后代代谢组的 PCA** 为考察仪器的精密度、样品的分布情况,观察造模后大鼠体内代谢轮廓发生的改变,将预处理后的数据矩阵导入 SIMCA 14.1 软件,进行无监督的 PCA,见图 2。PCA 是通过降维降噪找出能够代表原来变量的统计方法,可区分组间差异,在多维空间对样本间差异进行直观显示<sup>[12]</sup>。结果显示,尿液代谢组所得模型参数分别为  $ESI^+ : R^2 X = 0.748, Q^2 = 0.520$ ;  $ESI^- : R^2 X = 0.843, Q^2 = 0.651$ 。本研究建立模型的  $R^2 X$ 、 $Q^2$  均大于 0.5,表明模型具有良好的解释率及预测率。所有 QC 样品分布较集中,表明系统较稳定,所建立的方法具有良好的稳定性和重复性。正常组与模型组在一定范围内聚集良好,并且 2 组之间有明显的分离趋势,说明经造模,大鼠体内代谢物的代谢紊乱,尿液中内源性代谢产物产生显著改变。

**3.3 慢性炎症大鼠及其给药后代代谢组的 PLS-DA** 为直观反映 BYHWD 对慢性炎症大鼠尿液异常代谢

的调节作用,去除 QC 样本,将预处理后的数据矩阵导入 SIMCA 14.1 软件,各组进行 PLS-DA,见图 3。各 2 组之间能被很好地分开,组内样本在一定范围内实现了良好的聚类,说明正常组与模型组、模型组与 BYHWD 各给药组大鼠尿液中的代谢物发生了明显的变化,代谢组学能够有效地应用于慢性炎症的诊断。给药组的样品点逐渐接近正常组的样品点,表明 BYHWD 干预慢性炎症大鼠后,大鼠的代谢轮廓有由炎症模型向正常恢复的发展趋势。此外,对已分析的 2 组间的 PLS-DA 模式判别分别使用 200 次的置换检验,见图 4。所得尿液代谢组的模型参数为  $ESI^+ : R^2 = (0, 0.747), Q^2 = (0, -0.642)$ ;  $ESI^- : R^2 = (0, 0.739), Q^2 = (0, -0.737)$ 。

**3.4 慢性炎症大鼠及其给药后代代谢组的 OPLS-DA** 为消除自变量矩阵( $X$ )中与量矩阵( $Y$ )无关的噪音影响,提高模型的有效性和解析能力,在 PLS-DA 的基础上,采用 OPLS-DA 进行正交变换矫正,见

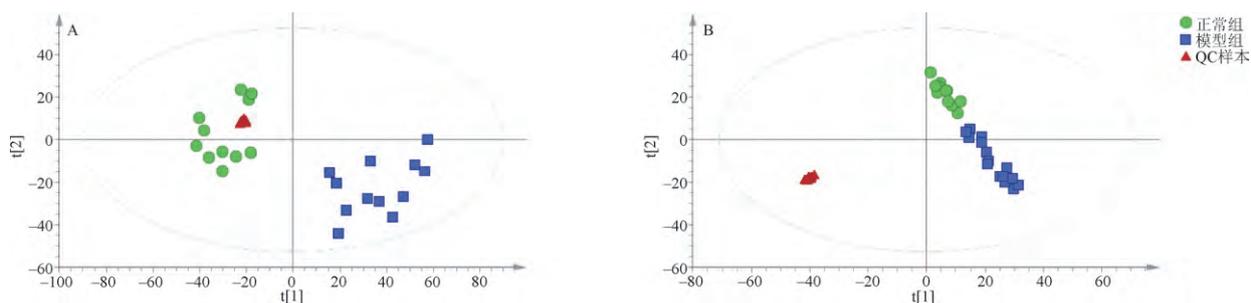


图2 各组大鼠尿液代谢的 PCA 图  
Fig.2 PCA diagrams of urine metabolism of rats in each group

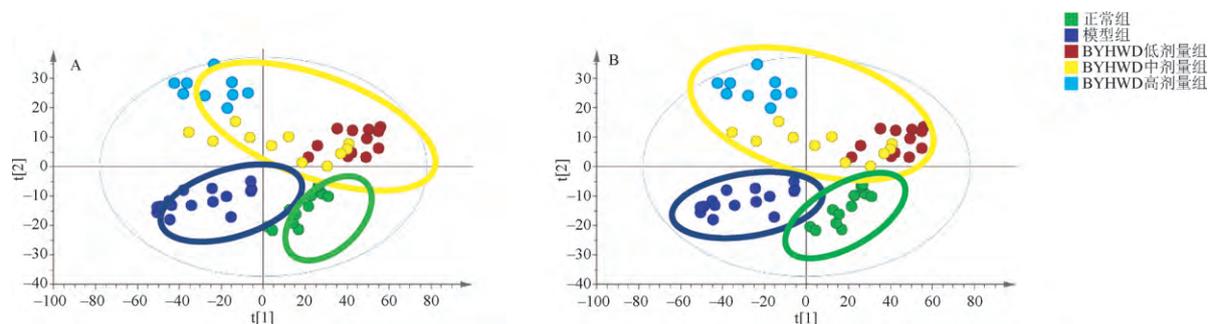


图3 各组大鼠尿液代谢的 PLS-DA 图  
Fig.3 PLS-DA diagrams of urine metabolism of rats in each group

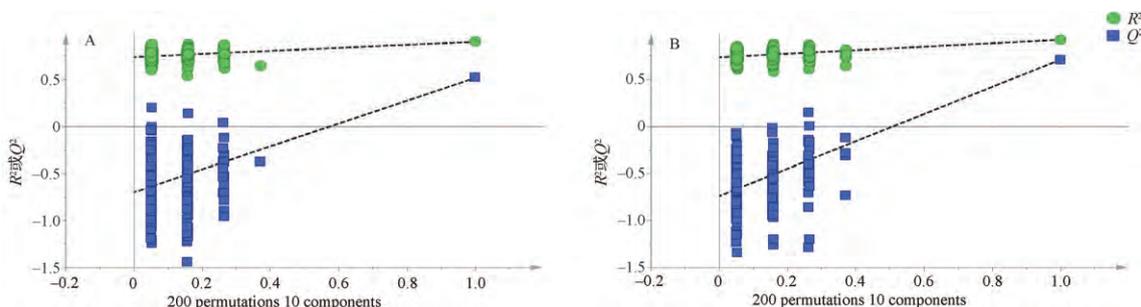


图4 各组大鼠尿液代谢的 PLS-DA 置换检验  
Fig.4 PLS-DA displacement test of urine metabolism of rats in each group

图5。从 OPLS-DA 的结果可以看出所有样本均处于 95%置信区间内,2 组样本之间有明显的差异,证实了正常组与模型组、模型组与各给药组大鼠体内代谢物发生紊乱<sup>[14]</sup>。为验证模型的稳定性和可靠性,对已分析的 2 组间 OPLS-DA 模式判别分别使用 200 次的置换检验,见图 6。所得尿液代谢组的模型参数如下。正常组与模型组之间  $ESI^+ : R^2 = (0, 0.998), Q^2 = (0, -0.545)$ ;  $ESI^- : R^2 = (0, 0.999), Q^2 = (0, -0.57)$ 。模型组与 BYHWD 低剂量组之间  $ESI^+ : R^2 = (0, 0.999), Q^2 = (0, -0.505)$ ;  $ESI^- : R^2 =$

$(0, 0.999), Q^2 = (0, -0.550)$ 。模型组与 BYHWD 中剂量组之间  $ESI^+ : R^2 = (0, 0.998), Q^2 = (0, -0.544)$ ;  $ESI^- : R^2 = (0, 0.999), Q^2 = (0, -0.545)$ 。模型组与 BYHWD 高剂量组之间  $ESI^+ : R^2 = (0, 1.000), Q^2 = (0, -0.498)$ ;  $ESI^- : R^2 = (0, 0.999), Q^2 = (0, -0.703)$ 。同时,  $R^2$  和  $Q^2$  的回归方程最右侧的值差距较小,表明模型的稳定性和可靠性较高, OPLS-DA 模式没有过拟合。

**3.5 慢性炎症大鼠及其给药后尿液内源性代谢物含量变化** 大鼠尿液代谢组中潜在生物标志物在各

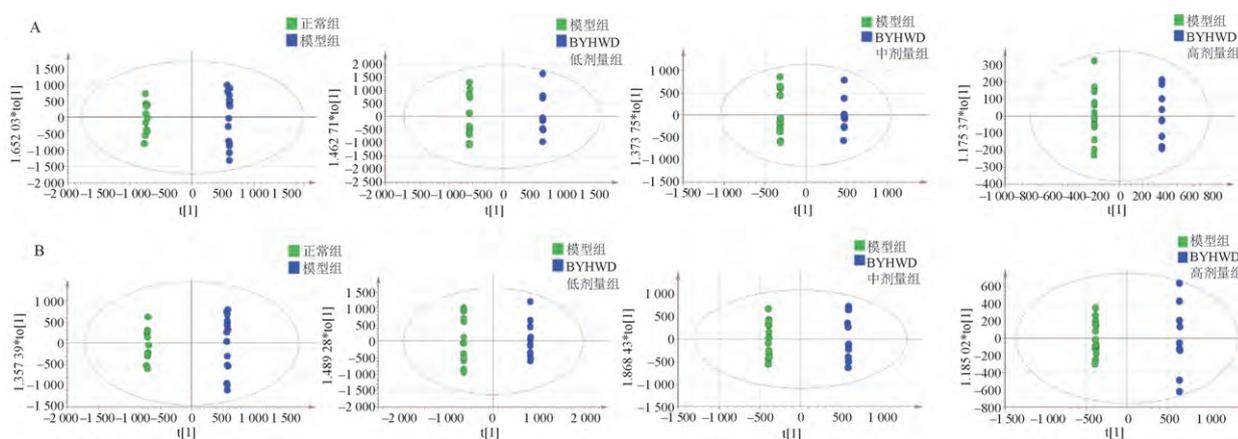


图5 各组大鼠尿液代谢的OPLS-DA图

Fig. 5 OPLS-DA diagrams of urine metabolism of rats in each group

组中的相对含量采用提取的丰度值( $\bar{x} \pm s$ )表示,结果见表2、3。与正常组比较,模型组中有25个物质含量发生改变,其中孕三醇、胆碱丝氨酸、雌酮-2,3-苯醌、AzII、15-十六烷基硫酸、3'-唾液乳糖、2,4,6-三羟基苯甲醛、*N*-乙酰血清素等14个物质的含量显著上升( $P < 0.05$ );4,6-二羟基喹啉、甲硫酰苯丙氨酸、邻氨基苯甲酸盐、9-顺式维甲酸、尿石素A等11个物质的含量显著下降( $P < 0.05$ )。给药后,BYHWD能够回调其中的24个内源性生物标志物,中剂量使大多数物质调节至正常水平。此外,BYHWD对尿液中AzII、3'-唾液酰乳糖、4-羟基安非他酮、苯醌乙酸的调节呈剂量依赖性。

为了比较潜在生物标志物在各组的含量变化,利用HILOT(hiplot.com.cn)将样品含量转化成可视化的热图,见图7。

**3.6 内源性差异化合物代谢通路的初步分析** 将上述鉴定得到的25个标志物导入MetaboAnalyst 5.0进行通路分析及富集分析。慢性炎症大鼠尿液中有4条通路发生变化,分别为①泛酸和辅酶A生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis),与其相关的主要代谢物为泛酰巯基乙胺;②色氨酸代谢(tryptophan metabolism),与其相关的主要代谢物为4,6-二羟基喹啉、邻氨基苯甲酸盐、*N*-乙酰血清素;③视黄醇代谢(retinol metabolism),与其相关的主要代谢物为9-顺式维甲酸;④丙酸代谢(propanoate metabolism),与其相关的主要代谢物为泛酰巯基乙胺,见图8。通过结合KEGG数据库及相关文献,进行代谢通路的关联和分析,建立了代谢物和代谢通

路间的通路网络示意图,见图9。

#### 4 讨论

炎症是许多疾病的基本病理过程之一,LPS是介导炎症损伤的最主要的病原分子之一,许多疾病与LPS诱导的炎症密切相关<sup>[15]</sup>。但是,研究发现当使用LPS干预建立动物炎症模型时,若单次使用LPS的剂量较大( $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),则会导致剧烈炎症反应,不可避免导致实验动物死亡<sup>[16]</sup>。为此,本实验参考文献<sup>[17]</sup>,以较小剂量LPS重复间断尾静脉注射建立符合慢性炎症病理发展过程特点的炎症模型。

由图2可知,本实验的QC样本在PCA得分图上具有较好的集中度,表明所建方法的重复性和稳定性良好,所得差异物能反映样本之间的生物学差异。正常组与模型组各组样本点相对集中,并且2组之间分离良好,说明造模之后,大鼠尿液内源性代谢产物存在显著差异。图3显示各组别之间分离良好,均实现了良好的聚类,其所在位置表明,给予BYHWD治疗后,慢性炎症大鼠尿液的代谢逐渐回调到正常水平上,BYHWD对慢性炎症具有治疗作用。OPLS-DA和200次置换检验验证了本次实验所建立的模型具有较高的稳定性和可靠性。结合VIP和One-way ANOVA,从大鼠尿液中筛选出25个与慢性炎症相关的潜在生物标志物。由表2、3可知,经LPS干扰后,与正常组相比,慢性炎症大鼠体内有14个物质的含量显著上升( $P < 0.05$ ),11个物质的含量显著下降( $P < 0.05$ )。给予药物治疗后,绝大多数内源性代谢物呈现良好的回调趋势,不同剂

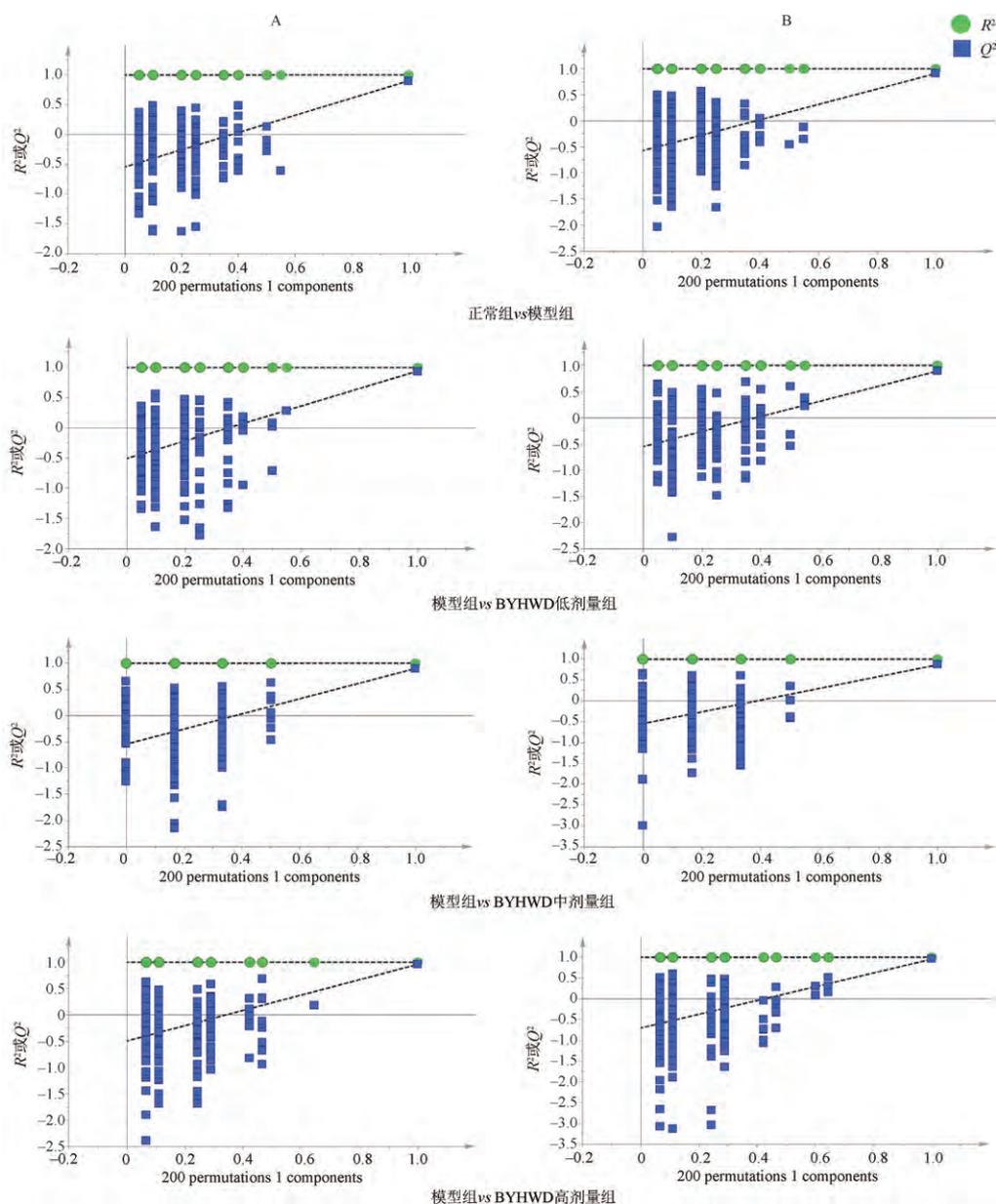


图 6 各组大鼠尿液 OPLS-DA 置换检验

Fig. 6 OPLS-DA displacement test of urine of rats in each group

量 BYHWD 呈现不同的治疗效果, BYHWD 中剂量使大多数生物标志物回归正常水平, 其治疗效果最为显著, BYHWD 高剂量对代谢组的调节作用相对较弱。课题组前期研究表明<sup>[7]</sup>, 3 个剂量的 BYHWD 均能够降低 LPS 诱导的慢性炎症反应, 与正常组比较, 模型组大鼠血浆中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 含量显著升高; 与模型组相比, BYHWD 中剂量组大鼠血浆 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 含量极显著降低, BYHWD 低剂量组大鼠血浆 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 含量显著降低, 与代

谢组学研究结果相一致。同时, 有研究表明<sup>[18]</sup>, BYHWD 中剂量能够较好地增加脑缺血小鼠脑组织 TRIF 蛋白表达, 同时, 当君药黄芪的剂量较大时体内致炎因子含量较中剂量增加, 治疗效果降低<sup>[19]</sup>。本研究中, BYHWD 主要影响慢性炎症大鼠 4 个代谢通路, 与通路相关的代谢物为 4,6-二羟基喹啉、邻氨基苯甲酸盐、9-顺式维甲酸、泛酰巯基乙胺、N-乙酰血清素。中药复方的作用机制具有多层次、多靶点、多效应等特点, 本研究从代谢组的角度进一

表2 慢性炎症大鼠尿液正离子模式下潜在生物标志物的丰度值( $\bar{x}\pm s$ )Table 2 Abundance of potential biomarkers under positive mode in chronic inflammation rat urine( $\bar{x}\pm s$ )

No.	代谢物名称	$m/z$	$t_R/\text{min}$	化学式	$P$	VIP	正常组( $n=12$ )
1	4,6-二羟基喹啉(4,6-dihydroxyquinoline)	340.1311	3.42	$C_9H_7NO_2$	0.0004	1.680	3060.43±1211.40
2	孕三醇(pregnatriol)	359.2590	8.26	$C_{21}H_{36}O_3$	0.0016	1.539	1682.72±613.02
3	甲硫酰苯丙氨酸(methionyl-phenylalanine)	314.1531	0.68	$C_{14}H_{20}N_2O_3S$	0.0001	1.462	900.26±224.95
4	邻氨基苯甲酸盐(anthranilate)	314.1547	0.85	$C_{17}H_{25}NO_2$	0.0001	1.257	1367.92±382.94
5	胆碱丝氨酸(cholylserine)	166.1152	1.02	$C_{12}H_{26}N_8O_3$	0.0001	2.849	7313.97±1246.45
6	雌酮-2,3-苯醌(estrone-2,3-quinone)	143.0771	1.20	$C_{18}H_{20}O_3$	0.0001	1.124	428.41±155.95
7	利他林酸(ritalinic acid)	237.1620	6.07	$C_{13}H_{17}NO_2$	0.0001	1.184	1213.44±384.70
8	AzII	550.2750	7.32	$C_{54}H_{82}O_{23}$	0.0053	1.269	811.47±296.89
9	十三烷醇(tridecanol)	239.1765	7.70	$C_{13}H_{28}O$	0.0001	1.531	389.82±116.83
10	9-顺式维甲酸(9-cis-retinoic acid)	144.1235	4.94	$C_{20}H_{30}O$	0.0001	1.170	1130.07±326.06
11	香茅基- $\alpha$ -甲苯酸酯(citronellyl $\alpha$ -toluate)	566.4258	9.47	$C_{18}H_{26}O_2$	0.0089	1.357	2168.57±841.38
12	环己烷十一酸(cyclohexanoundecanoic acid)	291.2294	15.99	$C_{17}H_{32}O_2$	0.0003	1.929	2238.44±608.45

No.	模型组 ( $n=15$ )	造模后 变化趋势	BYHWD组			给药后 调节趋势
			低剂量( $n=12$ )	中剂量( $n=11$ )	高剂量( $n=9$ )	
1	1495.43±613.34	↓ <sup>2)</sup>	630.95±241.73	608.53±268.43	603.05±363.74	↓
2	3138.63±1248.24	↑ <sup>2)</sup>	1917.56±965.41	2254.71±899.35	3113.35±956.72	↓
3	439.56±137.81	↓ <sup>2)</sup>	1266.95±547.89 <sup>4)</sup>	808.95±234.81 <sup>3)</sup>	420.42±147.12	↑ <sup>5)</sup>
4	512.59±165.62	↓ <sup>2)</sup>	1786.04±495.01 <sup>4)</sup>	1404.55±560.65 <sup>4)</sup>	751.50±221.70	↑ <sup>5)</sup>
5	11616.05±2121.77	↑ <sup>2)</sup>	8778.67±2941.05 <sup>3)</sup>	9129.78±2732.85	12390.48±2256.72	↓ <sup>5)</sup>
6	1155.87±328.69	↑ <sup>2)</sup>	303.47±168.29 <sup>4)</sup>	551.06±222.07 <sup>4)</sup>	780.88±198.97 <sup>4)</sup>	↓ <sup>5)</sup>
7	458.96±162.99	↓ <sup>2)</sup>	2048.98±753.22 <sup>4)</sup>	1535.33±750.18 <sup>4)</sup>	480.20±176.28	↑ <sup>5)</sup>
8	2072.33±1196.72	↑ <sup>2)</sup>	1467.17±882.93	1250.41±606.78	828.90±240.40 <sup>3)</sup>	↓ <sup>5)</sup>
9	155.07±65.61	↓ <sup>2)</sup>	614.15±191.95 <sup>4)</sup>	463.39±256.53 <sup>4)</sup>	172.23±48.02	↑ <sup>5)</sup>
10	335.27±136.41	↓ <sup>2)</sup>	1897.22±767.85 <sup>4)</sup>	1453.33±664.82 <sup>4)</sup>	526.37±167.98	↑ <sup>5)</sup>
11	3467.31±1274.61	↑ <sup>1)</sup>	1773.87±665.52 <sup>3)</sup>	2085.24±824.98	3204.23±750.31	↓ <sup>5)</sup>
12	5473.31±2322.94	↑ <sup>2)</sup>	1981.14±833.38 <sup>4)</sup>	2668.29±743.73	4321.25±1392.92	↓ <sup>5)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;↓.下降;↑.上升;<sup>5)</sup>某一个剂量的BYHWD对慢性炎症大鼠有显著回调作用(表3同)。

表3 慢性炎症大鼠尿液负离子模式下潜在生物标志物的丰度值( $\bar{x}\pm s$ )Table 3 Abundance of potential biomarkers under negative mode in chronic inflammation rat urine( $\bar{x}\pm s$ )

No.	代谢物名称	$m/z$	$t_R/\text{min}$	化学式	$P$	VIP	正常组( $n=12$ )
1	15-十六烷基硫胺(15-hexadecanoylsolamin)	837.6737	0.55	$C_{51}H_{94}O_6$	0.0002	1.183	455.92±139.05
2	3'-唾液乳糖(3'-sialyllactose)	632.2064	0.62	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	0.0021	2.523	3196.58±1601.99
3	2,4,6-三羟基苯甲醛(2,4,6-trihydroxybenzaldehyde)	153.0189	0.66	$C_7H_6O_4$	0.0001	1.259	268.74±114.22
4	$\beta$ -D-3-呋喃核糖尿酸( $\beta$ -D-3-ribofuranosyluric acid)	335.0404	0.85	$C_{10}H_{12}N_4O_7$	0.0003	1.708	261.17±68.91
5	尿石素A(urolithin A)	263.0132	6.84	$C_{13}H_8O_4$	0.0001	1.717	2044.39±734.21
6	羟脯氨酸-半胱氨酸(hydroxyprolyl-cysteine)	269.0366	8.38	$C_6H_{14}N_2O_4S$	0.0004	1.741	1767.48±879.21
7	4-羟基安非他酮(4-hydroxy bupropion)	236.0853	8.46	$C_{13}H_{18}ClNO_2$	0.0003	1.163	430.76±274.09
8	泛酰巯基乙胺(pantetheine)	277.1199	8.52	$C_{11}H_{22}N_2O_4S$	0.0002	1.243	603.29±258.27
9	1-羟基蒽醌(1-hydroxyanthraquinone)	447.0895	9.07	$C_{21}H_{22}O_{12}$	0.0002	1.012	618.61±292.67
10	N-乙酰血清素(N-acetylserotonin)	199.0863	9.72	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	0.0001	1.846	841.58±246.91
11	开链赖氨酸(merodesmosine)	200.1179	10.18	$C_{18}H_{34}N_4O_6$	0.0001	1.033	224.02±65.21
12	苯醌乙酸(benzoquinoneacetic acid)	497.0727	11.96	$C_8H_6O_4$	0.0001	1.515	1692.25±633.11
13	N-乙酰苯丙氨酸(N-lactoylphenylalanine)	236.0947	15.74	$C_{12}H_{15}NO_4$	0.0018	1.407	1154.05±499.79

No.	模型组 ( $n=15$ )	造模后 变化趋势	BYHWD组			给药后 调节趋势
			低剂量( $n=12$ )	中剂量( $n=11$ )	高剂量( $n=9$ )	
1	1282.63±609.32	↑ <sup>2)</sup>	497.87±249.50 <sup>4)</sup>	619.75±183.38 <sup>4)</sup>	950.45±328.90	↓ <sup>5)</sup>
2	6423.55±2260.05	↑ <sup>2)</sup>	2037.38±705.93 <sup>4)</sup>	2532.86±803.36 <sup>4)</sup>	3087.94±1187.82 <sup>4)</sup>	↓ <sup>5)</sup>
3	1105.54±443.38	↑ <sup>2)</sup>	197.46±37.03 <sup>4)</sup>	362.02±154.69 <sup>4)</sup>	887.65±146.19	↓ <sup>5)</sup>
4	1514.07±885.81	↑ <sup>2)</sup>	408.55±170.79 <sup>4)</sup>	418.30±230.87 <sup>4)</sup>	1181.83±277.09	↓ <sup>5)</sup>
5	245.47±190.65	↓ <sup>2)</sup>	4113.45±2315.96 <sup>4)</sup>	2267.38±747.83 <sup>3)</sup>	379.69±200.50	↑ <sup>5)</sup>
6	167.25±52.48	↓ <sup>2)</sup>	5402.30±1080.48 <sup>4)</sup>	2092.07±893.24 <sup>4)</sup>	522.89±212.04	↑ <sup>5)</sup>
7	1406.37±717.99	↑ <sup>2)</sup>	1178.66±822.71	972.18±851.90	357.16±243.44 <sup>3)</sup>	↓ <sup>5)</sup>
8	236.87±117.81	↓ <sup>2)</sup>	728.89±288.57 <sup>4)</sup>	614.49±265.61 <sup>4)</sup>	359.70±71.75	↑ <sup>5)</sup>
9	188.81±87.77	↓ <sup>1)</sup>	1130.64±510.72 <sup>4)</sup>	597.77±392.16	336.29±155.98	↑ <sup>5)</sup>
10	2816.12±1156.30	↑ <sup>2)</sup>	235.86±31.41 <sup>4)</sup>	506.23±166.26 <sup>4)</sup>	1843.78±354.69	↓ <sup>5)</sup>
11	777.67±268.76	↑ <sup>2)</sup>	133.82±63.49 <sup>4)</sup>	306.47±109.83 <sup>4)</sup>	425.02±191.53 <sup>4)</sup>	↓ <sup>5)</sup>
12	14.09±10.73	↓ <sup>2)</sup>	1101.15±595.14	1683.13±762.94 <sup>4)</sup>	5973.90±997.74 <sup>4)</sup>	↑ <sup>5)</sup>
13	2232.20±908.50	↑ <sup>2)</sup>	1159.14±577.06 <sup>4)</sup>	1424.62±543.27	1631.39±432.80	↓ <sup>5)</sup>

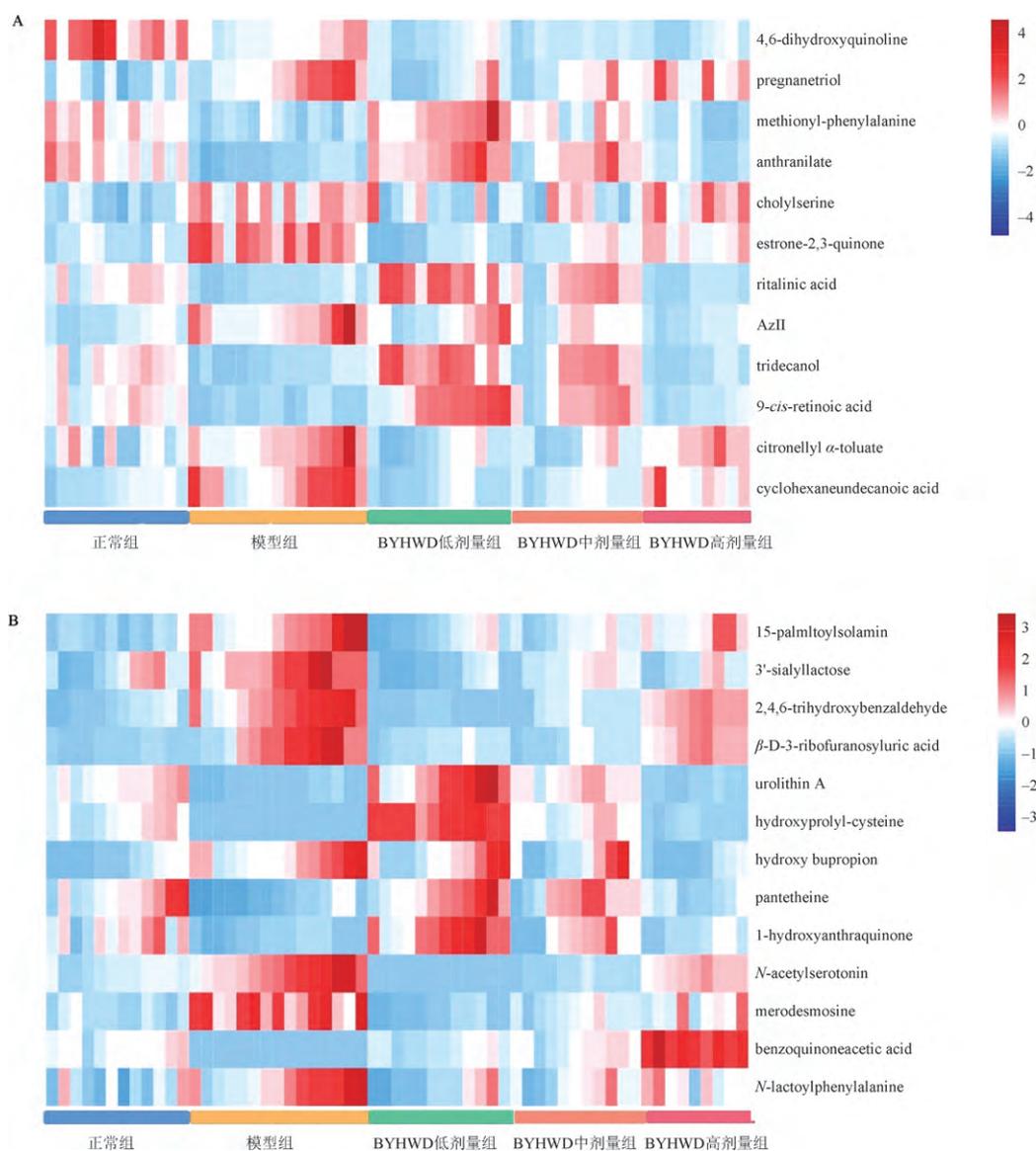


图 7 各组大鼠尿液潜在生物标志物的热图

Fig. 7 Heatmap of potential biomarkers in urine in rats of each group

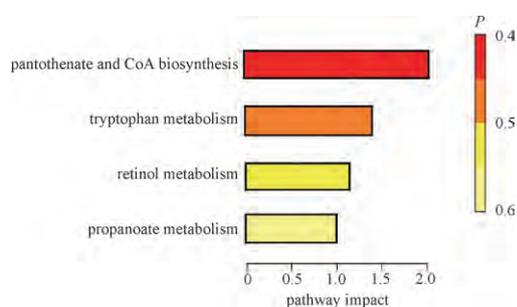
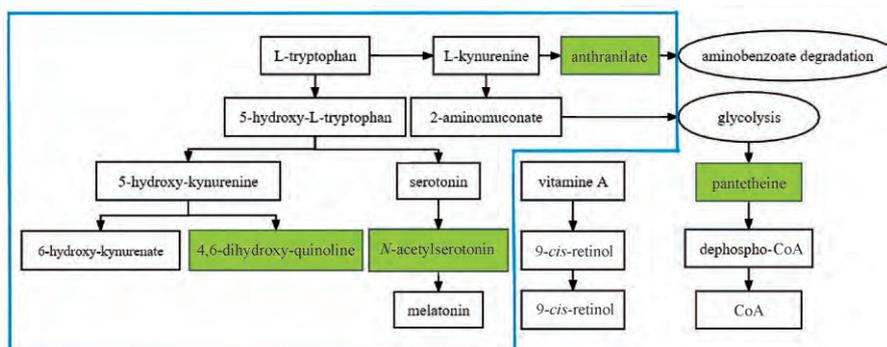


图 8 补阳还五汤干预慢性炎症的尿液代谢通路富集分析

Fig. 8 Enrichment analysis of metabolic pathways in Buyang Huanwu Decoction intervention of chronic inflammation

步揭示了 BYHWD 用量的精准性及机制的复杂性。

4,6-二羟基喹啉存在于所有生物体中,且其在生物体内由 5-羟基犬尿氨酸生成。犬尿氨酸的分解代谢有 2 个主要分支,第一条是在犬尿氨酸 3-单加氧酶的作用下,生成 3-羟基犬尿氨酸,又在犬尿氨酸酶的催化作用下生成 3-羟基邻苯甲酸,继续在氧化酶的作用下生成喹啉酸,4,6-二羟基喹啉即属于第一条代谢分支中的产物;第二条分支是在犬尿氨酸氨基转移酶催化下不可逆地生成犬尿酸<sup>[20]</sup>。犬尿氨酸通路与炎症关系密切。一方面,机体中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等促炎因子能够增强犬尿氨



蓝色线框代表色氨酸代谢通路,绿色底纹物质代表补阳还五汤治疗慢性炎症大鼠代谢通路中相关的代谢物。

图9 代谢物及相关代谢通路的网络

Fig. 9 Network of metabolomics and related metabolic pathways

酸通路第二分支犬尿酸的代谢水平<sup>[21-23]</sup>,此外,犬尿酸能够导致 Th1 细胞产生较少的促炎因子,如 IL-2 和 IFN- $\gamma$  等,同时也促进 Th2 细胞产生更多的抗炎因子,如 IL-10 和 IL-13 等<sup>[24]</sup>,从而对炎症起到调节作用。本研究中,推测随着大鼠尾静脉注射 LPS,促炎因子增强犬尿酸第二分支通路,分解产生犬尿酸,而致使另一条分支代谢生成 4,6-二羟基喹啉的含量减少;有研究表明<sup>[25]</sup>,BYHWD 中的黄芪可增加体内犬尿酸生成,推测 BYHWD 可通过增强犬尿酸生成犬尿酸此条分支,且此过程为不可逆,因此机体产生更多犬尿酸,从而调节炎症,而另一分支代谢产物 4,6-二羟基喹啉水平进一步降低。

邻氨基苯甲酸盐属于芳香单萜类化合物,其由色氨酸代谢通路产生,参与到 2-硝基苯甲酸盐的代谢途径中,产生 3-羟基邻氨基苯甲酸盐 (3-HAT)<sup>[26]</sup>。3-HAT 的存在会导致丙酮酸的累积,进而导致神经系统中毒。同时,超氧化物歧化酶 (SOD) 能够加速 3-HAT 自动氧化,加剧 3-HAT 介导的氧化损伤,促进炎症发生。3-HAT 在自氧化过程中会产生葱酰基自由基,诱发氧化应激<sup>[27]</sup>,加重炎症反应。本研究中,模型组大鼠尿液中邻氨基苯甲酸盐降低,推测邻氨基苯甲酸盐更多参与到了 2-硝基苯甲酸盐的代谢途径中,产生 3-HAT 增多,诱发机体炎症。

9-顺式维甲酸 (9-*cis*-RA) 能够调节维甲酸反应基因表达,并且是维甲酸 X 受体 (RXR) 的高亲和力配体<sup>[28]</sup>。研究表明<sup>[29]</sup>,9-*cis*-RA 作为 RXR 配体能够帮助 RXR 参与到 NADPH 氧化酶 NF- $\kappa$ B 信号通路调控,显著降低活性氧 (ROS) 的产生,从而拮抗高

糖诱导的 HUVECs 炎症反应。本研究中,模型组大鼠尿液中 9-*cis*-RA 含量降低,推测 LPS 刺激导致细胞 ROS 释放增加,机体内 ROS 水平失调<sup>[30]</sup>,为调节 ROS 水平,机体内产生更多的 RXR,帮助降低 ROS 的产生,从而导致 9-*cis*-RA 含量降低。BYHWD 能够有效降低机体 ROS 的含量<sup>[31]</sup>,协调机体的炎症反应和 9-*cis*-RA 水平。

泛酰巯基乙胺是辅酶 A 的生物合成前体,在生物体的碳水化合物、脂肪、蛋白质和新陈代谢过程中起着重要作用<sup>[32]</sup>。在辅酶 A 的循环、代谢过程中,泛酰巯基乙胺被水解产生泛酸,其在炎症过程中具有抗氧化作用<sup>[33]</sup>。与正常组相比,模型组大鼠体内泛酰巯基乙胺显著下降,可能机体为抵抗炎症,水解泛酰巯基乙胺水平加强,产生泛酸增多,起到抗氧化的作用。

N-乙酰血清素 (NAS) 是体内血清素转化为褪黑素时的中间产物,已有实验证实<sup>[34-35]</sup>,其具有抗炎、抗氧化、清除自由基等作用。与正常组相比,模型组大鼠体内 NAS 含量显著上升,推测机体为对抗 LPS 诱导的炎症,产生 NAS 增多;给药后,NAS 含量降低,推测 BYHWD 对慢性炎症有调节作用,机体炎症水平降低,进而产生具有抗炎作用的 NAS 减少。

综上所述,根据实验结果及文献调研结果推测,BYHWD 对动物内源性代谢发挥调节作用,其治疗 LPS 诱导的慢性炎症分子机制与调节机体的内源性代谢物及相关代谢通路密切相关,最终结果有待进一步分子生物学验证。

#### [参考文献]

- [1] 龚勇珍,孙少卫,廖端芳. 细胞炎症反应与脂质代谢的相互作用及调节[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(6): 623.
- [2] 成果,廖瑛,周君,等. 脂多糖诱导大鼠吸入性肺炎动物模

- 型的建立[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(5): 396.
- [ 3 ] 张瑜, 丁耀华, 魏晓露, 等. 蟾皮中吲哚烷胺类生物碱对 LPS 活化的中性粒细胞抗炎活性及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18): 4774.
- [ 4 ] TAKI N N, KOTERA J, OHTA H. 12-Oxo-phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin, attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in microglia[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2016, 473(4): 1288.
- [ 5 ] 侯贝贝, 游宇, 刘玉晖, 等. 补阳还五汤对 LPS 诱导巨噬细胞活化与自噬的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 16.
- [ 6 ] 吴晓博, 谭雨晴, 田盼盼, 等. 补阳还五汤加减治疗慢性心衰临床疗效的系统评价及试验序贯分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 188.
- [ 7 ] 傅馨莹, 孙正骥, 龙清吟, 等. 补阳还五汤苷类组分介导 NF- $\kappa$ B 通路抗动脉粥样硬化炎症反应的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(1): 202.
- [ 8 ] 王玮玮. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化 Q-markers 及其病症药代动力学研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [ 9 ] 杨梦, 胡志希, 李琳, 等. 参麦注射液对高血压心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 334.
- [ 10 ] 汪文龙, 李安, 陈兰英, 等. 交趾黄檀心材改善大鼠急性心肌缺血的 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 1043.
- [ 11 ] 姜丽, 李艳, 李冰涛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的黄连解毒汤抗动脉粥样硬化大鼠血浆代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(6): 694.
- [ 12 ] CHONG J, WISHART D S, XIA J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis[J]. *Curr Bioinform*, 2019, 68(1): 86.
- [ 13 ] 刘竊玉, 穆芳园, 王一程, 等. 蜘蛛香提取物治疗腹泻型肠易激综合征模型大鼠粪便 UPLC-MS/MS 代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 678.
- [ 14 ] 邓欣祺, 王哲义, 张雨婷, 等. 基于多组学联合技术探讨中风病谷胱甘肽代谢失衡引起的铁死亡[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2000.
- [ 15 ] YUAN H, PERRY C N, HUANG C, et al. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2009, 296(2): 470.
- [ 16 ] FENG Y K, YANG Q H, XU J C, et al. Effects of HMGB1 on PMN apoptosis during LPS-induced acute lung injury [J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 85(3): 214.
- [ 17 ] 李琦, 钱桂生, 张青, 等. 全身炎症反应综合征: 急性肺损伤大鼠肺组织 IL-4 mRNA 表达及 AP-1 活性变化的研究[J]. 中国急救医学, 2002, 22(8): 435.
- [ 18 ] 潘琳娜, 杨昉, 樊萍, 等. 基于 TRIF-IFN $\beta$  信号通路补阳还五汤抗气虚血瘀证脑缺血损伤作用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2119.
- [ 19 ] 张林, 孙宏伟, 马贤德, 等. 不同黄芪剂量的补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血清 IL-1, IL-6, IL-10 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 62.
- [ 20 ] 赵泽欣, 郭茜, 刘晓华, 等. 色氨酸犬尿酸代谢失调与炎症在精神分裂症中的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2022, 22(5): 305.
- [ 21 ] KINDLER J, LIM C K, WEICKERT C S, et al. Dysregulation of kynurenine metabolism is related to proinflammatory cytokines, attention, and prefrontal cortex volume in schizophrenia[J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(11): 2860.
- [ 22 ] NOYAN H, ERDAG E, TUZUN E, et al. Association of the kynurenine pathway metabolites with clinical, cognitive features and IL-1beta levels in patients with schizophrenia spectrum disorder and their siblings[J]. *Schizophr Res*, 2021, 229: 27.
- [ 23 ] SCHWIELER L, LARSSON M K, SKOGH E, et al. Increased levels of IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia significance for activation of the kynurenine pathway[J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2015, 40(2): 126.
- [ 24 ] LEE E E, HONG S Z, MARTIN A S, et al. Inflammation in schizophrenia: cytokine levels and their relationships to demographic and clinical variables [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2017, 25(1): 50.
- [ 25 ] 刘武平. 基于代谢组学技术的蜜炙黄芪炮制特征成分的药理学研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [ 26 ] YOSHIE H, TAKAMICHI M, TAI T, et al. A novel degradative pathway of 2-nitrobenzoate via 3-hydroxyanthranilate in *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7[J]. *Fems Microbiol Lett*, 2000, 190(2): 185.
- [ 27 ] DYKENS J A, SULLIVAN S G, STEM A. Glucose metabolism and hemoglobin reactivity in human red blood cells exposed to the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, quinolinate and picolinate[J]. *Biochem Pharmacol*, 1989, 38(10): 1555.
- [ 28 ] KANE M A. Analysis, occurrence, and function of 9-*cis*-retinoic acid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(1): 10.
- [ 29 ] NING R B, ZHU J, CHAI D J, et al. RXR agonists inhibit high glucose-induced upregulation of inflammation by suppressing activation of the NADPH oxidase-nuclear factor- $\kappa$ B pathway in human endothelial cells[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 692.
- [ 30 ] 王琴琴, 韩珊, 李新星, 等. 毛蕊花苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型的作用及其机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4217.
- [ 31 ] 郑晓宇, 张业昊, 宋文婷, 等. 补阳还五汤对脑缺血后神经血管单元影响的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5226.
- [ 32 ] ROTHMANN M, KANG M J, VILLA R, et al. Metabolic perturbation of an essential pathway: evaluation of a glycine precursor of coenzyme A[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(16): 5962.
- [ 33 ] JUNG S, KIM M K, CHOI B Y. The long-term relationship between dietary pantothenic acid (vitamin B5) intake and C-reactive protein concentration in adults aged 40 years and older[J]. *Nutr Metab Cardiovas*, 2017, 27(9): 806.
- [ 34 ] JIE W, PRASANTH S A, RACHEL R, et al. Efficacy of *N*-acetylserotonin and melatonin in the EAE model of multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmune Pharm*, 2016, 11(4): 763.
- [ 35 ] LUO C L, YANG Q, LIU Y C, et al. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor *N*-acetylserotonin in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health[J]. *Free Radical Bio Med*, 2019, 130: 215.

[责任编辑 马超一]