

# 山楂总黄酮对心肌缺血大鼠尿液代谢谱的影响

赵文婷<sup>1</sup>, 刘 溪<sup>2</sup>, 朱竟赫<sup>3</sup>, 袁 宇<sup>1</sup>, 胡丽萍<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; <sup>2</sup> 广州白云山医药销售有限公司, 广州 510032;

<sup>3</sup> 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034

**摘要:** 为了研究山楂总黄酮对异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌缺血大鼠尿液代谢谱的影响及其代谢通路, 取雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为正常组、模型组和山楂总黄酮组(0.276 g/kg), 灌胃给药, 连续 5 天。<sup>1</sup>H NMR 检测大鼠尿液代谢物变化, 并进行模式识别分析。确认了 6 个生物标志物, 山楂总黄酮(0.276 g/kg)上调 TMAO、Creatinine( $P < 0.05$ ), 下调 DMA、DMG、Hippurate、Citrate( $P < 0.05$ )。通路分析表明山楂总黄酮可能通过调节钙超载、氧化应激、三羧酸循环以及肾功能改善心肌缺血。本文为在细胞和分子水平阐释山楂总黄酮抗心肌缺血的作用机制提供了参考, 为筛选山楂总黄酮中的抗心肌缺血成分提供了代谢组学分析手段。

**关键词:** 代谢组学; 心肌缺血; 山楂总黄酮; 尿液

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.003

## Effect of Hawthorn Flavonoids on <sup>1</sup>H NMR Urine Metabolism of Myocardial Ischemia Rats

ZHAO Wen-ting<sup>1</sup>, LIU Xi<sup>2</sup>, ZHU Jing-he<sup>3</sup>, YUAN Yu<sup>1</sup>, HU Li-ping<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

<sup>2</sup>Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Marketing Co., Ltd., Guangzhou 510032, China;

<sup>3</sup>The second affiliated hospital of liaoning medical university 110034, China

**Abstract:** The aim of the present study was to investigate the effect of Hawthorn flavonoids on for myocardial ischemia rats induced by isoproterenol, and subsequently discuss the different metabolic pathway. <sup>1</sup>H NMR was used to exam the urine metabolites of rats, the pattern identification were adapted to revealed potential biomarkers in urine. There were significant differences in urine metabolites among the groups, six urinary metabolic products were compared with the control group. After the treatment of hawthorn flavonoids (0.276 g/kg), the levels of DMA, DMG, Hippurate and citrate decreased ( $P < 0.05$ ), TMAO and Creatinine increased ( $P < 0.05$ ). Myocardial Ischemia Rats showed significant difference metabolic profile compared with the normal group. Hawthorn flavonoids (0.276 g/kg) changed the myocardial Ischemia metabolic profile to the normal status in some extent possibly through its regulation on the oxidative stress, calcium overload of cells, tricarboxylic acid cycle as well as the renal function.

**Key words:** metabolomics; myocardial Ischemia; hawthorn flavonoids; urine

随着中国人口老龄化的加快, 心血管病的流行趋势日益明显, 导致心血管发病人数持续增加, 目前, 心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位, 今后十年心血管病患者人数将快速增长, 心血管病给社会带来的负担日益加重<sup>[1]</sup>。中医药可有效地控制心血管病的危险因素, 对动脉粥样硬化性心血管病有益。深入研究中药有效成分、作用机制的相关

课题, 对于治疗心血管疾病具有重大意义。

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge. 的干燥成熟果实。黄酮类化合物是山楂主要活性成分, 主要含有槲皮素(queretin)、槲皮苷(querctin)、金丝桃苷(hyperoside)等活性成分, 可调节血压和脂质代谢、降低血糖和三元脂肪酸丙酯、降低血清胆固醇、清除体内自由基, 具有抗氧化等生物活性。天然抗氧化剂将促进新的心肌缺血治疗策略<sup>[2]</sup>。山楂黄酮类化合物在心肌缺血治疗方面具有重要应用开发价值。

收稿日期: 2018-03-02 接受日期: 2018-07-25

基金项目: 辽宁省自然科学基金面上项目(2015020708)

\* 通信作者 Tel: 86-24-31202851; E-mail: huliping705@163.com

皮下注射大剂量异丙肾上腺素(ISO)诱导的大鼠心肌缺血模型,其心电图演变、心肌代谢改变及组织病理学变化与人类急性心肌梗死非常接近<sup>[3]</sup>。是心肌缺血药物评价常用的病理模型。

代谢组学反映了多种因素作用下的终点效应,因此它能为阐明异丙肾上腺素诱导的动物模型中生化反应和相关代谢通路特点以及研究心肌保护药物提供新的分析平台<sup>[4]</sup>。

本文基于<sup>1</sup>H NMR 技术研究异丙肾上腺素诱导的心肌缺血大鼠尿液代谢谱变化及山楂总黄酮对心肌缺血代谢标志物的影响,分析其生化代谢通路,为在细胞和分子水平阐释山楂总黄酮抗心肌缺血的作用机制提供参考,为进一步筛选山楂总黄酮中的抗心肌缺血成分提供代谢组学分析手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 仪器

Bruker AV 600 MHz 超导傅立叶变换核磁共振波谱仪(Bruker 公司,德国);多导生理监护仪(BIOPAC 公司,美国);5415R 型高速离心机(Beckerman 公司,德国);Lambdal P40 型紫外可见分光光度计(PE 公司,美国)。

#### 1.1.2 药品与试剂

异丙肾上腺素(Chemical Industry CO. LTD, Tokyo;批号 FVKEH)。山楂药材购于安国市奇康中药材有限责任公司,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida Bunge* 的干燥成熟果实。

山楂总黄酮的制备:取 100 g 山楂药材,用 10 倍量 75% 乙醇回流提取两次,每次 1 h,滤过,合并滤液,并浓缩,通过 AB-8 大孔吸附树脂柱,70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩至 250 mL(山楂总黄酮含量 61.33 mg/mL)即得。

试验药物的配制:取山楂总黄酮浓缩液,用蒸馏水稀释成 2.76% (g/mL) 的供试品溶液,冰箱保存备用。

#### 1.1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠 24 只,体重 250 g  $\pm$  10 g,7 周龄,SPF 级。购自北京维通利华实验动物中心,许可证编号:SCXK(京)2011-0012。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模型建立、分组与给药

观察大鼠的一般状况,于造模前腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg,仰卧位固定,用多导生理监护仪连续描记 II 导联心电图 10 min。筛选出心电图合格大鼠。取合格雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为正常组、模型组和山楂总黄酮组。山楂总黄酮组灌胃给予山楂总黄酮 0.276 g/kg,模型组、正常组灌胃给予同体积蒸馏水,连续 5 天。第一天给药后,山楂总黄酮组和模型组皮下注射异丙肾上腺素 2 mg/kg,正常组皮下注射同体积生理盐水,连续 3 天。末次给药 30 min 后进行模型评价。

#### 1.2.2 模型评价

使用多导生理监护仪 NOTOCORD-hem 3.5 心电图分析软件,记录并计算 J 点(QRS 波群终点与 ST 段交接处)变化值。结果以每个时间段 J 点变化绝对值进行比较。HE 染色观察心肌形态学改变。

#### 1.2.3 标本采集及样品处理

尿液样本采用代谢笼采集,末次给药 3 h 后开始收集至记录心电图前的尿液,冷冻备用。

样品处理:取尿液室温融化,13 000 rpm 离心 10 min,取上清液 400  $\mu$ L 加入 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液(0.2 M, pH7.4)200  $\mu$ L,涡旋 30 s,静置 10 min,13 000 rpm 离心 10 min,加入 TMSP (0.2 mg/mL) 100  $\mu$ L,涡旋 30 s,移入内径 5 mm NMR 测试管。

### 1.3 <sup>1</sup>H NMR 分析检测

Bruker AV 600 MHz 超导脉冲傅立叶变换 NMR 谱仪,采用预饱和的 1D NOESY 脉冲序列,取参数:谱宽 131 072 Hz,弛豫延迟 2 s,采样点数 64 k,累加次数 64 次;在弛豫延迟间采用预饱和方式抑制水峰。FID(free induction decay,自由感应衰减)信号经过傅立叶变换为 NMR 图谱。以 TMSP 为化学位移参考峰的位置,并定位 0。将(10.0 ~ 0.2 内的谱图进行分段(每段长度 0.04 ppm)并积分,同时排出包含溶剂峰和尿素峰的部分(4.6 ~ 6.0),将所产生的所有积分数据归一化,以 Excel 文件格式保存。

### 1.4 数据处理

采用 Bruker AMIX(version 3.0)对<sup>1</sup>H NMR 测得的尿液代谢指纹谱进行峰切割并积分,化学位移为 4.64 ~ 5.26 ppm(水峰)的区域不积分,其他区域每隔 0.04 ppm 进行积分,将积分后的数据进行归一化,导出数据文件。将数据导入 SIMCA-P11.5(瑞士 Sweden 公司)。采用 Pareto scaling 处理后进行

PLS-DA 分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

#### 2.1.1 模型评价

心电图见图 1, 心电图评价结果见表 1。造模后心电图分析表明, 山楂总黄酮组、模型组分别与正常

组比较, J 点偏移绝对值均有显著性差异; 山楂总黄酮组与模型组比较, J 点偏移绝对值无显著性差异。给药后心电图分析表明, 山楂总黄酮组与模型组比较, J 点偏移绝对值明显减小, 差异显著; 给药后与造模后自身比较, 山楂总黄酮组 J 点偏移绝对值有显著差异, 模型组则无显著差别, 表明山楂总黄酮具有抗大鼠心肌缺血作用。

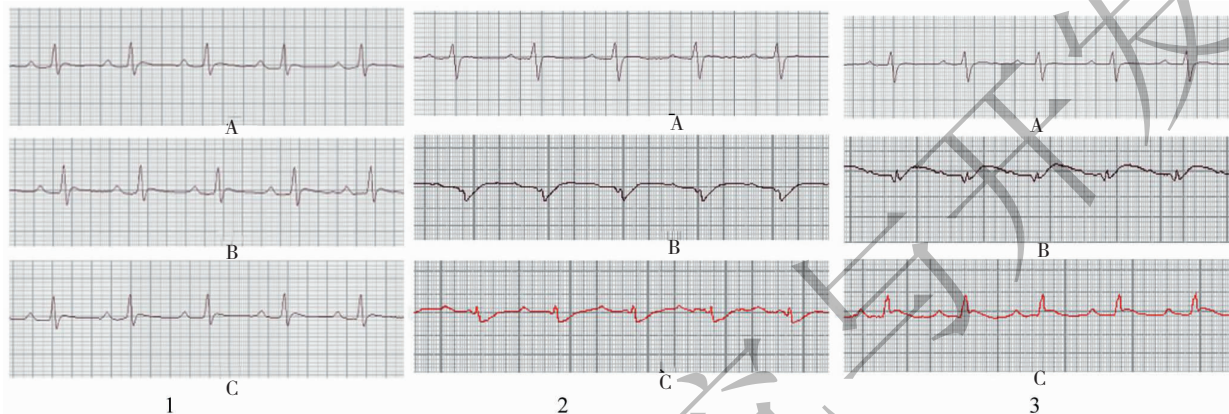


图 1 大鼠心电图分析

Fig. 1 Analysis of rat electrocardiogram

注: 图 1-1: 造模前; 图 1-2: 造模后; 图 1-3: 给药后。A: 正常组; B: 模型组; C: 山楂总黄酮组。

Note: Fig. 1-1: Before modeling; Fig. 1-2: after modeling; Fig. 1-3: after treatment. A: normal group; B: model group; C: hawthorn total flavonoid group.

表 1 山楂总黄酮对异丙肾上腺素诱导心肌缺血大鼠心电图 J 点偏移绝对值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 The effect of hawthorn falconoid on the absolute value of ECG J point in myocardial ischemia rats induced by isoproterenol ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	造模前 J 点偏移绝对值 Before modeling The absolute value of ECG J point (mv)	造模后 J 点偏移绝对值 After modeling The absolute value of ECG J point (mv)	给药后 J 点偏移绝对值 After treatment The absolute value of ECG J point (mv)	给药后 J 点变化率 After treatment J point change rate (%)
正常组 Control group	-	0.007 ± 0.006	0.006 ± 0.004	0.007 ± 0.006	6.12
模型组 Model group	-	0.014 ± 0.010	0.121 ± 0.036 *	0.095 ± 0.035	21.49
山楂总黄酮组 Hawthorn total flavonoid group	0.276	0.011 ± 0.007	0.115 ± 0.045 *	0.018 ± 0.020 <sup>△#</sup>	84.35 *

注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ ; 同组造型后与给药后比较, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ ; compared drug after with model after, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ .

心肌组织形态学评价结果见图 2。正常组大鼠心肌 HE 染色心肌纤维排列整齐, 心肌及内膜细胞连续完整, 心肌细胞染色清晰、均匀, 细胞核致密, 无水肿, 间质小血管无明显扩张、瘀血或出血未见炎细胞浸润。如图 A。模型组心肌纤维大范围肿胀、断裂, 有多处变性、坏死和融合区; 心内膜内皮不完整。心肌细胞变性、肥大, 细胞浆凝集呈颗粒状或溶解呈空泡状, 细胞核增大, 染色质疏松; 心肌间小血管扩

张充血; 局部出血或淋巴细胞、中性粒细胞浸润。如图 B。山楂总黄酮组明显减轻上述病理改变。如图 C。

#### 2.1.2 各组大鼠尿液代谢<sup>1</sup>H NMR 图谱分析

大鼠尿液典型的<sup>1</sup>H NMR 图谱如图 3 所示。

#### 2.1.3 大鼠尿液代谢的多元统计分析

为了获得导致显著差异的代谢物信息, 采用 PLS-DA 对三组大鼠尿样代谢物谱的数据进行分

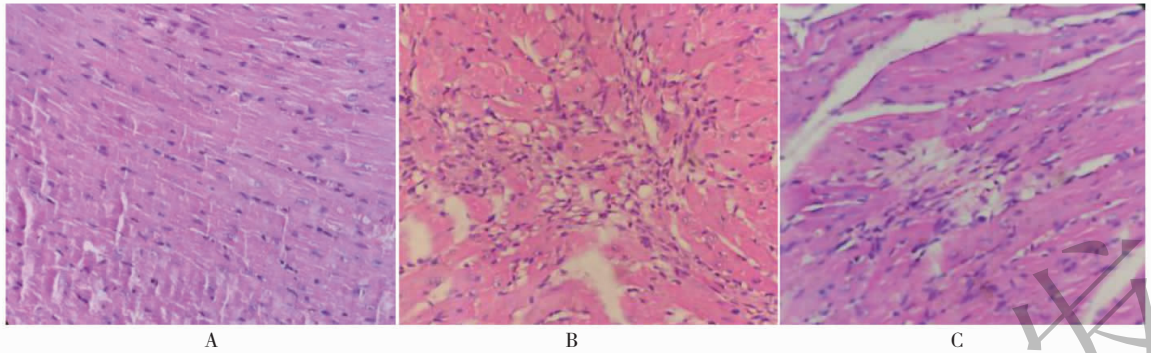


图2 山楂总黄酮对 ISO 诱导的心肌缺血大鼠心肌组织形态学变化的影响(×400)

Fig. 2 Effect of hawthorn flavonoids on myocardial histomorphology induced by ISO-induced myocardial ischemia in rats (×400)

注:A:正常组;B:模型组;C:山楂总黄酮组。

Note: A: normal group; B: model group; C: hawthorn flavonoids group.

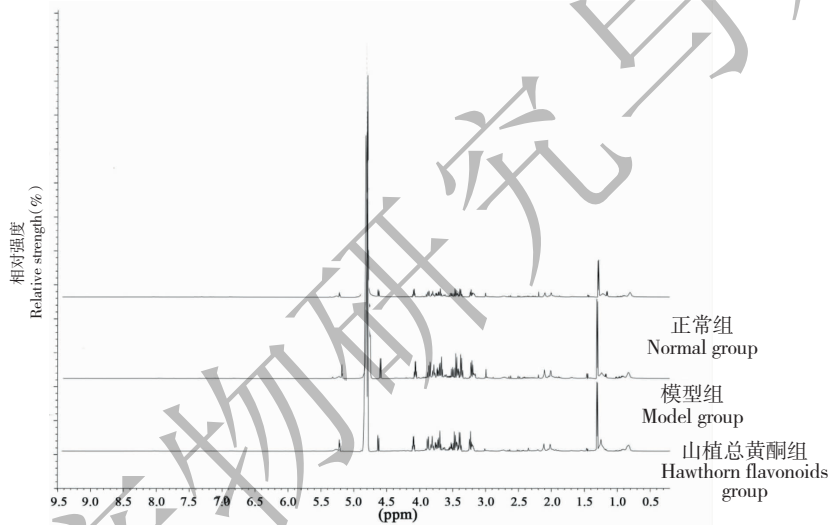


图3 各组大鼠尿液<sup>1</sup>H NMR 代谢指纹图谱

Fig. 3 Typical urine metabolite profile of rats in each group detected by <sup>1</sup>H NMR

析,获得 PLS-DA 模型。对模型的质量进行检验,结果拟合度良好, $R^2X = 0.934$ ,  $R^2Y = 0.925$ ,  $Q^2 = 0.905$ ,表明模型可靠。进一步对模型进行排序验证,模型未“过拟合”,能较好的描述样本,并可作为模型生物标记物寻找的前提。由 PLS-Dascore 图可知(图 4),山楂总黄酮组、模型组和正常组大鼠尿液的样本点完全分离,位于不同的区域,表明三组大鼠的尿液代谢谱存在差异,山楂总黄酮介于模型组和正常组之间。山楂总黄酮能有效干预异丙肾上腺素所致的大鼠心肌缺血。

以载荷图和变量的 VIP 值筛选出对组间分离贡献较大的变量( $VIP > 2$ ),结合 T 检验结果( $P < 0.05$ )确定组间具有显著差异的生物标志物<sup>[5]</sup>。采用在线数据库 Metlin 以及 HMDB 检索,对差异性表

达的代谢物进行鉴定,并与文献比对确认,确认了 Hippurate、DMG、Citrate、DMA、TMAO、Creatinine 等 6 个心肌缺血相关的潜在生物标志物(表 2)。与正常大鼠比较,心肌缺血大鼠体内代谢发生了改变,Hippurate、DMG、Citrate、DMA 水平上调,TMAO、Creatinine 水平下降。与模型组比较,山楂总黄酮治疗后大鼠尿液中的 Hippurate、DMG、Citrate、DMA 水平下降,TMAO、Creatinine 水平上升,说明山楂总黄酮对这些改变具有调节作用,山楂总黄酮使心肌缺血大鼠的尿液代谢谱向正常大鼠的代谢状态回归。

#### 2.1.4 代谢通路分析

ISO 所致心肌缺血大鼠尿液中 6 个生物标志物主要涉及氧化应激、三羧酸循环等代谢途径(表 3)。



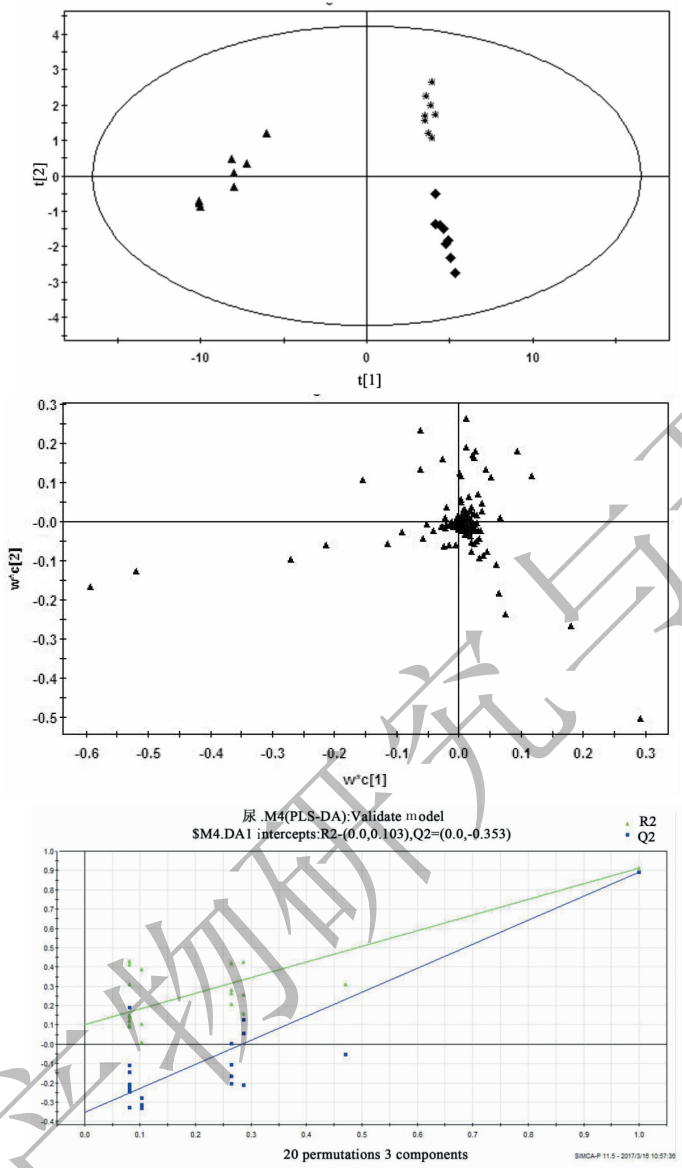


图4 大鼠尿液 PLS-DA 分析得分图、载荷图和排序验证图

Fig. 4 PLS-DA score plot, loading plot and permutation test of rat urine metabolite profiles

注:空白组;▲模型组;山楂总黄酮组。

Note: Control group; ▲ model group; drug-treated group.

### 3 结论

ISO 为  $\beta$  受体兴奋药,通过加快心率增强心肌收缩力等环节增加心肌耗氧量,引起心肌缺血甚至梗塞变化。通过比较对照组和给药组心电图和病理切片变化程度,可对药物疗效做出结论<sup>[6]</sup>。本文心电图和病理形态学评价结果表明心肌缺血造型成功,山楂总黄酮能够对抗 ISO 诱导的心肌缺血。

本研究基于<sup>1</sup>H NMR 代谢组学技术和多变量数据分析技术对正常组、模型组和山楂总黄酮组的大

鼠尿液代谢谱进行分析。结果表明三组代谢谱存在明显差异,并确认了 Hippurate、DMG、Citrate、DMA、TMAO、Creatinine 等 6 个代谢标志物。心肌缺血大鼠体内代谢较正常组发生了改变, Hippurate、DMG、Citrate、DMA 水平上调, TMAO、Creatinine 水平下降。而山楂总黄酮对这些改变具有调节作用,使 Hippurate、DMG、Citrate、DMA 下降, TMAO、Creatinine 上升。山楂总黄酮使心肌缺血大鼠的尿液代谢谱向正常大鼠的代谢状态回归。代谢通路分析表明 6 个代谢标志物主要涉及氧化应激、钙超载、三羧酸循环等

表 2 模型组和山楂总黄酮组尿液生物标志物的变化

Table 2 Changes of urine potential biomarkers in model rats and Hawthorn falconoids treated rats

化学位移 Chemical shift (ppm)	名称 Name	模型组 Model rats		给药组 Drug treated rats	
		T-检验 T-test (P value)	与正常组相比 Compared with control rats	T-检验 T-test (P value)	与模型组相比 Compared With model rats
7.82	马尿酸盐 Hippurate	4.4E-05	↑ * * *	7.6 E-03	↓ * * *
4.06	肌酸酐 Creatinine	5.0E-04	↓ * * *	3.8 E-05	↑ * * *
3.26	氧化三甲胺 TMAO	2.9E-03	↓ * *	4.9 E-05	↑ * * *
2.74	二甲氧基安非他 DMA	1.5E-02	↑ *	3.5 E-02	↓ *
2.91	甘氨酸 DMG	1.3E-03	↑ * *	5.3 E-03	↓ * *
2.66	柠檬酸 Citrate	6.9E-02	↑ *	8.4 E-05	↓ * * *

表 3 心肌缺血大鼠尿液中 6 种生物标志物相关代谢通路

Table 3 Related pathway of 6 potential biomarkers in rats urine

代谢通路名称 Pathway name	潜在生物标志物 Potential biomarkers	通路 Path	详情 Details
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	肌酸酐, 柠檬酸, 肌酐 Creatine, Citrate, Creatinine	Map00330	KEGG
三羧酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	甘氨酸, 柠檬酸, 乳酸 DMG, Citrate, Lactate	Map00020	KEGG
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	马尿酸盐, 肌酐, 甘氨酸 Hippurate, Creatinine, DMG	Map00190	KEGG
脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	柠檬酸, 氧化三甲胺 Citrate, TMAO	Map00061	KEGG

代谢途径,并提示了肾功能的改变。

据 Nature 报道<sup>[7]</sup>, Hippurate 含量的改变与心血管疾病和氧化损伤有密切的关系。Tang 等<sup>[8]</sup> 研究认为, Hippurate 是与尿毒症相关的代谢物, 肾功能不全时, 肾血浆流量明显降低, Hippurate 排出减少而在体内潴积。

心肌缺血大鼠尿液中 Hippurate 含量增加可能表明了心肌缺血大鼠的氧化应激反应以及肾功能的损伤。山楂总黄酮明显降低 Hippurate 含量, 提示其能够改善心肌缺血氧化应激状态和肾功能损伤。

据文献报道, DMG 可以激活甘氨酸门控氯离子通道(甘氨酸受体), 抑制激动剂诱导的 L 型电压依赖性钙通道开放以减弱  $Ca^{2+}$  内流及降低其细胞内浓度, 从而抑制钙超载<sup>[9]</sup>。此外, 还有研究表明 DMG 能抑制缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的自由基(ROS)生成, 以减轻心肌细胞的凋亡并增加细胞内 SOD 等保护蛋白和 NO 的合成而发挥细胞保护作用<sup>[10]</sup>。

心肌缺血大鼠尿液中 DMG 含量升高, 提示心肌细胞  $Ca^{2+}$  内流增多, 自由基(ROS)大量生成。山楂总黄酮使 DMG 含量下降, 说明山楂总黄酮改善了心肌缺血大鼠的钙超载状态, 减少了自由基(ROS)生成。

王勇等研究表明, 心肌缺血状态下 TCA 通路的异常, 冠心病进行性恶化与转归的基础, 其中 Citrate、乳酸等特定分子异常表达可能成为心肌缺血临床诊断与治疗的靶标<sup>[11]</sup>。本文心肌缺血大鼠尿液中 Citrate 升高, 提示 ISO 诱导的心肌缺血 TCA 通路出现异常, 山楂总黄酮降低 Citrate 含量使三羧酸循环通路向正常代谢状态回归。

本文研究发现 TMAO 是 ISO 所致心肌缺血大鼠尿液中标志物之一。文献报道, 血浆 TMAO 水平升高与心血管疾病发生及心肌梗死、脑卒中、死亡等不良心血管事件发生独立相关<sup>[12]</sup>。但目前还没有相关文献就心肌缺血尿液 TMAO 水平与心肌缺血的关系的报道。而有研究表明 TMAO 在尿液中的浓

度降低与已报道的肾髓质损害的氯化汞作用相似<sup>[13]</sup>。并且临床中冠心病患者常伴肾功能水平下降<sup>[14,15]</sup>。提示尿液中 TMAO 作为标志物可能反映了心肌缺血的肾功能改变。山楂总黄酮能够上调心肌缺血大鼠尿液 TMAO 水平,说明其改善了心肌缺血伴有的肾功能损害。

总之,6 个代谢物可能是 ISO 诱导的大鼠心肌缺血尿液生物标志物。特别是 Hippurate 和 TMAO 可能反应了心肌缺血伴有的肾功能改变而具有临床价值,尿液 TMAO 水平与心肌缺血的关系值得进一步研究。山楂总黄酮可能通过调节氧化应激、钙超载、三羧酸循环以及肾功能发挥抗心缺血作用。本文为在细胞和分子水平深入阐释山楂总黄酮抗心肌缺血作用机制提供了参考,为进一步筛选山楂总黄酮中的抗心肌缺血成分提供了代谢组学分析手段。

#### 参考文献

- National Center for Cardiovascular Diseases, China(国家心血管中心). Report on cardiovascular diseases in China(中国心血管病报告)[R]. Beijing: Encyclopedia of China Publishing House, 2017:2.
- Xing HY, Liu Y, Sun JH, *et al.* Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *BBRC*, 2011, 410: 759-765.
- Nimrala C Puvanakarishma R. Protective role of cucurum in against iso proterenol induced myocardial infarction in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 159:85-93.
- Yan B(严蓓), A JY(阿基业), Hao HP(郝海平), *et al.* Evaluation of myocardial ischemia rat model based on metabolomic method of small molecule metabolites of plasma and cardiac muscle[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2013, 48: 104-112.
- Yang XJ(杨秀娟), Deng Y(邓毅), Wu GX(吴国霞), *et al.* Metabolomic analysis of enriching blood function of *Angelica Sinensis* body and tail using UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2018, 30: 176-184.
- Xu SY(徐淑云). Experimental methodology of pharmacology(药理实验方法学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1985:714.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472:57-63.
- Tang WH, Wang Z, Levison BS, *et al.* Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368:1575-1584.
- Zhao X(赵雪), Lu DX(陆大祥), Qi RB(戚仁斌), *et al.* Role of glycine receptor in protection of glycine against anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes[J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2006, 22:2113-2118.
- Miller RR. Alcohol-induced membrane lipid peroxidation[J]. *CRC Press*, 2004, 9:339-364.
- Wang Y(王勇), Li ZF(李中峰), Chen JX(陈建新), *et al.* Study of mini-pig serum of coronary heart disease(chronic myocardial ischemia) with syndrome of blood stasia based on nuclear magnetic resonance metabolomics[J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学研究简报), 2011, 39:1274-1278.
- Viaene L, Thijs L, Jin Y, *et al.* Heritability and clinical determinants of serum indoxyl sulfate and p-cresylsulfate, candidate biomarkers of the human microbiome enterotype[J]. *PLoS One*, 2014, 9:e79682.
- Zhao JY(赵剑宇), Yan ZX(颜贤忠), Peng SQ(彭双清). Metabonomics study on nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37: 725-730.
- Hua HY(华何与), Cui Y(崔凯), Guan SY(关山越). Metabonomic study on plasma from unstable angina pectoris patients with phlegm-turbid syndrome and qi-deficiency and blood-stasis syndrome[J]. *J Changchun Univ Tradit Chin Med*(长春中医药大学学报), 2013, 29:578-581.
- Huang YL(黄亚丽), Zhang J(张静), Qi XZ(戚秀中). Material basis research of same treatment to different diseases in the treatment of coronary heart disease and liver cirrhosis of blood stasis syndrome basis on metabolomic profiling[J]. *Mod J Integr Tradit Chin W Med*(现代中西医结合杂志), 2017, 26:2053-2063.