

基于炎症大鼠代谢组学的马钱子炮制减毒存效机制研究

秦伟瀚,魏江平,张小梅,阳勇*

重庆市中药研究院,重庆 400065

摘要:运用动物模型、血浆药物化学及代谢组学方法,探讨马钱子炮制前后干预炎症大鼠作用机制。按不同剂量灌胃小鼠,以死亡率初步考察炮制前后毒性;建立大鼠蛋清性足跖肿胀模型,通过肿胀率和炎症因子水平评价炮制前后抗炎效果;采用高分辨质谱结合多元统计学,鉴定入血后的移行成分及相应的代谢产物;比较分析各实验组代谢轮廓及差异生物标志物,并构建其代谢通路。结果显示,高剂量下马钱子砂烫品的毒性要明显低于生品。生品和砂烫品均能显著降低大鼠足肿胀率和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 的水平,炮制前后在抗炎效果上差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。通过血浆药物分析,鉴定出了 12 个移行成分,以及相应 60 个代谢产物,S-plot 鉴定出 10 个差异性化合物。代谢组学实验共发现 10 个内源性代谢物含量发生显著变化 ($P < 0.05$),生物标志物主要涉及苯丙氨酸代谢、甘油磷脂代谢、谷氨酸及谷氨酰胺循环、精氨酸和脯氨酸代谢等途径。通过本研究确证马钱子生品和砂烫品均有较好抗炎治疗作用,高温炮制可以降低马钱子毒性;入血后有效成分应多为生物碱,经过 I 相反应就容易被体内清除;马钱子炮制抗炎、镇痛、减毒机制主要与氨基酸和脂质代谢相关。该实验结果进一步阐明了起效物质基础及体内作用机制,为后续炮制工艺改进和新药研发等提供科学支撑。

关键词:马钱子;炮制;抗炎作用;代谢组学;减毒存效

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)5-0825-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.5.012

Study on mechanism of attenuating toxicity and preserving effect of Strychnine Semen processing based on metabolomics in inflammatory rats

QIN Wei-han, WEI Jiang-ping, ZHANG Xiao-mei, YANG Yong*

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Using the methods of animal model, plasma pharmacochimistry and metabolomics, the mechanism of intervention of Strychnine Semen before and after processing inflammation in rats was investigated. The toxicity before and after processing was preliminarily investigated according to the mortality of mice given different doses. The rat model of egg white foot swelling was established, and the anti-inflammatory effect was evaluated by swelling rate and inflammatory factor level before and after processing. High resolution mass spectrometry combined with multivariate statistics were used to identify the migratory components and their metabolites. The metabolic profiles and different biomarkers of each experimental group were compared and analyzed, and their metabolic pathways were constructed. The results showed that the toxicity of sand-scorch product at high dose was significantly lower than that of raw product. Both raw and sand-scorch products could significantly reduce the swelling rate and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) of rats' feet, and there was no statistical difference in anti-inflammatory effect before and after processing ($P > 0.05$). Through plasma drug analysis, 12 transitional components and corresponding 60 metabolites were identified, and 10 different compounds were identified by S-plot. Metabolomics experiments found significant changes in the content of ten endogenous metabolites ($P < 0.05$). The biomarkers mainly involved phenylalanine metabolism, glycerophospholipid metabolism, glutamic acid and glutamine cycle, arginine and proline metabolism and other pathways. This study confirmed that both raw and sand-scorch products of Strychnine Semen had good anti-inflammatory effects, and high temperature processing could reduce the toxicity of Strych-

收稿日期:2023-07-14

接受日期:2024-01-30

基金项目:国家重大新药创制项目(2017ZX09101002-002-004);重庆市卫生健康委项目(2021ZY023651)

* 通信作者 Tel:86-23-89029068; E-mail: yangchem@126.com

nine Semen. After entering the blood, the active ingredients of the sand-scorch products should mostly be alkaloids, and they are easily eliminated by the body after I reaction. The difference analysis can indirectly prove that the anti-inflammatory effect of the sand-scorch products is higher than that of the raw products. The anti-inflammatory, analgesic and attenuated mechanisms of sand-scorch products are mainly related to amino acid metabolism and lipid metabolism. The experimental results further elucidated the active substance basis and the mechanism of action in vivo, and provided scientific support for the subsequent improvement of processing technology and the development of new drugs.

Key words: Strychnine Semen; processing; anti-inflammatory effect; metabolomics; attenuating toxicity and preserving effect

马钱子是我国重要且常用中药材,始载于《本草纲目》^[1]。有通络止痛、散结消肿之功效;主要用于治疗肿毒、乳痈、瘰疬等病症^[2,3]。生品马钱子毒性剧烈,极大限制了其临床运用。传统中医药认为炮制能够达到减毒存效作用,马钱子炮制方法众多,包括砂烫、油炸、土炒、豆腐制等^[4]。现代研究证明,马钱子在高温炒制过程中有效降低了主要毒性成分马钱子碱和土的宁的含量,生成毒性更低、治疗效果更佳的氮氧化物^[5,6]。现阶段研究仍然停留在特征成分分析层面,虽初步解释了马钱子炮制减毒机理,但由于马钱子化学成分复杂,进入人体后的吸收、转化、代谢、调控等机制尚不明确,这对于深入阐释马钱子药理作用及药效物质存在着阻碍。

近年来代谢组学借助高通量、高分辨率仪器得到迅速发展,特别是在中医药领域已有广泛应用,通过监测内源性小分子质变及量变,并结合机体功能状态的改变,从而阐释中药药效的分子机制^[7,8]。本研究以死亡率初步评价马钱子炮制前后毒性变化;以肿胀率和炎症因子水平评价炮制前后的抗炎效果;之后通过血浆药物化学分析入血后的起效物质。最后采用马钱子干预炎症模型对血浆中内源代谢物进行分析鉴定,从化学水平、分子水平、代谢水平探讨马钱子炮制前后减毒存效的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

Triple TOF5600TM 高分辨质谱仪(美国 AB 公司);LC-30AD 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);Microfuge-16 型高速离心机(美国贝克曼库尔特公司);BSA224S-CW 型万分之一分析天平(德国赛多利斯公司);高速中药粉碎机(河北慧采科技有限公司)。

1.2 试药

马钱子碱(批号:10284-201611;纯度 $\geq 98\%$)、土的宁(批号:10408-201611;纯度 $\geq 98\%$)均购于南昌贝塔生物科技有限公司;肉桂酸(批号:110786-202305;含量 98.8%)、没食子酸(批号:110831-

201906;含量 90.8%)、马钱苷酸(批号:111865-202005;含量 97.4%)(中国食品药品检定研究院);地塞米松(批号:1801233,规格 1 mL:5 mg,上海通用药业股份有限公司)。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(批号:AB-J0160、TD6087、AB-W20298A,上海艾比玛特医药科技有限公司);甲酸、乙腈、甲醇(质谱级,德国 Merck 公司);水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为市售分析纯。

马钱子购于重庆中药材市场,经四川省中医药科学院周先建副研究员鉴定为马钱科、马钱属植物马钱(*Strychnos vomica* L.)的干燥种子。

1.3 试验动物

雄性 Wistar 大鼠(SPF 级)101 只,体重 180 ~ 220 g;昆明小鼠(SPF 级)80 只,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g;均由重庆市中药研究院实验动物研究所提供,生产许可证号【SCXK(渝)2019-0004】。动物饲养于重庆市中药研究院实验动物研究所动物实验室 IVC 系统中,使用许可证号【SYXK(渝)2022-0006】,动物实验环境(温度 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50% ~ 65%),自由摄食和饮水。本研究动物实验内容由重庆市中药研究院实验动物福利伦理审查委员会审查批准(批准号:YHS2022-01)。

1.4 高分辨质谱条件

Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈,梯度洗脱(0 ~ 1.0 min, 6% B; 1.0 ~ 10.0 min, 6% \rightarrow 80% B; 10.0 ~ 12.0 min, 80% B; 12.0 ~ 12.1 min, 80% \rightarrow 6% B; 12.1 ~ 15.0 min, 6% B);流速:0.2 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:2 μL 。

电喷雾离子源;正离子模式;喷雾电压: +5 500 V;雾化气压力:52 psi;气帘气压力:17 psi;辅助气压力:48 psi;离子源温度:580 $^{\circ}\text{C}$;簇裂解电压:70 V;碰撞能量:33 eV;碰撞能区间:15 eV;信息关联采集模式结合多重质量亏损、动态背景扣除作为触发二级质谱采集的条件。

1.5 样品制备

1.5.1 砂烫马钱子制备

取洁净河砂置炒制容器内,用武火加热至滑利状态,投入生马钱子,不断翻动,炒至马钱子膨胀,当表面颜色变深至棕褐色时,取出,放凉后滤掉河砂,即得砂烫马钱子。将生品和炮制品用中药高速粉碎机粉碎,过80目筛备用。

1.5.2 灌胃样品制备

称取马钱子生品及炮制品粉末各50 g于1 000 mL圆底烧瓶中,加入10倍量90%乙醇,回流提取2次,每次2 h,合并滤液,减压挥尽乙醇后水浴浓缩得醇浸膏1.2、1.3 g;药渣再加入10倍量水,按照上述方法制备,得水浸膏11.4、12.8 g;将两种浸膏用蒸馏水溶解并定容至1 000 mL容量瓶,即得马钱子灌胃储备液,置4℃冰箱保存备用。

1.5.3 血浆样品采集与制备

造模完成后于大鼠眼眶静脉丛采血1 mL(肝素钠抗凝)。于高速离心机中(8 000 r/min)离心8 min,精密移取上层血浆于EP管中,超低温冰箱(-80℃)保存。精密移取血浆样本50 μL于EP管中,精密加入色谱级甲醇100 μL,涡旋震荡60 s,4℃静置10 min后12 000 r/min离心10 min,取100 μL上清液,用于高分辨质谱分析。再精密移取空白血浆样本50 μL,按照上述方法制备成质控样本,用以确保质谱仪的稳定性和重复性。

1.6 初步毒性评价方法

取KM小鼠70只,随机分成7组,每组10只,实验前禁食不禁水12 h,再按不同灌胃剂量(0、100、300、600 mg/kg)分为空白组(control group, Con)、生品组(raw product group, RP)和砂烫组(sand-scorch product group, SP)。一次性给药后即刻观察中毒症状并记录死亡动物只数。

1.7 大鼠蛋清性足跖肿胀炎症模型建立

取Wistar大鼠56只,随机分成7组,每组8只,即:空白组(control group, Con, 0.9%氯化钠溶液组)、模型组(model group, Mod, 0.9%氯化钠溶液组)、地塞米松阳性组(dexamethasone group, Dex, 150 mg/kg)、生品高剂量组(high-dose raw product group, RP-H, 50 mg/kg)、生品低剂量组(low-dose raw product group, RP-L, 15 mg/kg)、砂烫高剂量组(high-dose sand-scorch product group, SP-H, 50 mg/kg)和砂烫低剂量组(low-dose sand-scorch product group, SP-L, 15 mg/kg)。按照上述剂量连续灌胃7

d,每天灌胃1次,末次给药前1 h大鼠禁食不禁水。每只大鼠右后足跖皮下注入10%蛋清0.1 mL,在注入蛋清前及后0.5、1.5、2 h,用自制软皮尺测量大鼠肿胀肢体最大(足趾根部)周径,以致炎前后的测量值计算肿胀率:足跖肿胀率=(致炎后足跖最大周径-致炎前足跖最大周径)/致炎前足跖最大周径×100%。

1.8 大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平测定

造模完成2 h后,眼眶静脉丛取血至不含肝素钠的玻璃管中,4℃静置4 h,4℃4 000 r/min离心10 min。取上清液,使用ELISA检测TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

1.9 血浆代谢产物分析

取“1.7”项下砂烫高剂量组和生品高剂量组大鼠,第7 d造模后分别于0.5、1、2、4 h眼眶静脉丛取血0.5 mL于装有肝素钠的EP管中,12 000 r/min离心10 min,精密移取各时间点上层血浆50 μL于同一1.5 mL EP管中,加入色谱甲醇400 μL后涡旋提取2 min,12 000 r/min离心10 min,吸取上清液和空白对照液2 μL进样高分辨质谱,PeakView软件分析入血移行性成分,MetabolitePilot软件对移行成分的代谢产物进行鉴定,同时采用多元统计学对砂烫品、生品入血后的差异性成分进行分析。

1.10 代谢组学研究的动物分组及给药

在SPF级环境中喂养3 d,对45只Wistar大鼠进行称重,并按照随机数字表分为空白组、模型组、地塞米松组、砂烫组和生品组,每组各9只。实验组按照50 mg/kg剂量灌胃给药(按照2020年版《中华人民共和国药典》马钱子成人服用规定剂量:0.3~0.6 g,换算成大鼠灌胃的安全有效剂量为:31~62 mg/kg);地塞米松组按照150 mg/kg剂量灌胃给药;空白对照组和模型组给予同体积的生理盐水。连续给药7 d,每天称重,于第8 d造模后30 min,眼眶静脉丛取全血于EP管中,静置后超高速离心取血浆备用。

1.11 数据处理方法

高分辨质谱数据经OSI-SMMS软件进行转换,将结果导入SIMCA软件进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。借助METLIN、ChemSpider、Metabo Analyst、KEGG、GO等在线数据库及分析软件进行代谢标志物鉴定和代谢通路富集。两组数据结果差异性比较采用独立样本 t 检验:检验水平 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P<0.05$ 来判断差异性是否显著。

2 结果与分析

2.1 初步毒性实验

马钱子生品和砂烫品初步毒性实验结果见表1,由该结果可知,除灌胃生理盐水外(空白组),生品组的死亡率均高于砂烫组;当灌胃剂量为300 mg/kg和600 mg/kg时,砂烫组的死亡率与生品组相较有统计学差异($P < 0.05$);100 mg/kg在药典安

全剂量范围内,该剂量下仅生品组死亡1只;当灌胃剂量为600 mg/kg时,生品组100%死亡,而砂烫组仅60%死亡;由此可见生品马钱子的毒性应大于砂烫品。小鼠死亡时出现不同程度的呼吸急促、颤抖、惊厥等中毒现象,且死亡时间集中在1~24 h。各组存活小鼠多在4 h后开始自主进食饮水,48 h内排稀软便,之后恢复正常。

表1 炮制前后马钱子的初步毒性实验

Table 1 Preliminary toxicity experiment on Strychnine Semen before and after processing

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	死亡数量 Number of death				总计 Total	死亡率 Mortality rate(%)
		0~1 h	1~12 h	12~24 h	24~48 h		
Con	-	0	0	0	0	0	0
SP	100	0	0	0	0	0	0
RP		0	1	0	0	1	10
SP	300	0	2	1	0	3	30*
RP		0	3	2	1	6	60
SP	600	1	4	1	0	6	60*
RP		2	5	2	1	10	100

注:与生品组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with RP, * $P < 0.05$.

2.2 炮制前后抗炎作用比较

实验组、对照组和模型组的足跖肿胀率结果见表2,由该结果可知,地塞米松组的肿胀率要低于其它各组,与模型组差异显著($P < 0.05$),表明地塞米松抗炎治疗效果最好;其次为砂烫高剂量组和生品高剂量组,两组在1.5 h和2 h的肿胀率与模型组相

较有统计学差异($P < 0.05$),表明砂烫品和生品有一定的抗炎治疗效果。砂烫组和生品组在低灌胃剂量时,其肿胀率虽有降低,但与模型组相较并不显著($P > 0.05$),表明低剂量的药材提取物抗炎效果一般。该实验结果中砂烫组的肿胀率均略低于生品组,且两组间差异性较小($P > 0.05$)。

表2 炮制前后马钱子对大鼠足跖肿胀率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Strychnine Semen before and after processing on rat plantar swelling rate($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	致炎前足跖最大周长 Maximum circumference of the plantar before inflammation(mm)	肿胀率 Swelling rate(%)		
			0.5 h	1.5 h	2 h
Mod	-	3.56 ± 0.44	120 ± 17	109 ± 21	88 ± 15
Dex	150	3.49 ± 0.23	76 ± 10	61 ± 17*	42 ± 8*
RP-H	50	3.88 ± 0.43	91 ± 10	71 ± 12*	57 ± 17*
RP-L	15	3.74 ± 0.22	97 ± 6	89 ± 15	76 ± 12
SP-H	50	3.59 ± 0.31	88 ± 14	68 ± 15*	53 ± 18*
SP-L	15	3.67 ± 0.17	93 ± 11	82 ± 10	73 ± 15

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with Mod, * $P < 0.05$.

2.3 炮制前后对大鼠体内炎症因子水平的影响

实验组、地塞米松组、模型组和空白组的炎症因子检测结果见表3。由该结果可知,地塞米松组的炎症因子水平要低于其它组,与模型组相较有统计学差异,与空白组测量值最为接近,说明地塞米松有

较好的抗炎治疗效果。高剂量下生品组与砂烫组炎症因子水平均低于模型组,且有统计学差异($P < 0.05$),表明高剂量的马钱子提取物灌胃后确有一定的抗炎治疗效果。与模型组相较,低剂量实验组的炎症因子水平并不显著($P > 0.05$);而生品组与

砂烫组炎性因子水平均较为接近,表明马钱子炮制足跖肿胀率测定结果一致。前后抗炎作用差异不大($P > 0.05$)。该实验结果与

表3 各组大鼠体内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
Con	20.05 \pm 1.13	24.26 \pm 1.15	34.53 \pm 1.10
Mod	54.17 \pm 1.01 $^{\Delta}$	62.08 \pm 0.95 $^{\Delta}$	71.24 \pm 1.06 $^{\Delta}$
Dex	22.41 \pm 1.07*	26.82 \pm 1.09*	36.95 \pm 0.87*
RP-H	31.54 \pm 1.32*	32.52 \pm 1.17*	40.86 \pm 1.08*
RP-L	41.22 \pm 0.76	49.37 \pm 1.04	60.51 \pm 1.31
SP-H	27.37 \pm 1.25*	30.58 \pm 1.33*	38.10 \pm 1.46*
SP-L	40.87 \pm 1.02	47.06 \pm 0.88	58.66 \pm 1.09

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与空白组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note:Compared with Mod,* $P < 0.05$. Compared with Con, $^{\Delta}P < 0.05$.

2.4 血浆代谢产物分析

通过高分辨质谱的血浆代谢产物分析,共鉴定出12个移行成分(见表4),除肉桂酸、没食子酸和马钱苷酸外,其余成分均为生物碱,包括马钱子的特征性成分(马钱子碱、土的宁),以及高温炮制后的特征性成分(马钱子碱-N-氧化物、土的宁-N-氧化物)。采用MetabolitePilot软件鉴定出了相应的60个代谢产物(见表5),其中I相反应包括氧化、还原、水解、去甲基等代谢过程,II相反应包括乙酰化、

谷氨酰胺及乙酰半胱氨酸结合。按照“1.10”项下方法处理灌胃后含药血浆,采用多元统计学进行差异性分析;由得分图(见图1A)可以看出,砂烫品和生品的数据点区分明显,表明生品、砂烫品灌胃后的血浆中化学成分存在较大差异;由S-plot分析结果可知(见图1B、表6),共鉴定出了10个显著差异性化合物,其中生物碱占6个,以及3个有机酸和1个糖苷类成分。

表4 入血后移行性成分鉴定结果

Table 4 Identification results of transitional components after blood transfusion

编号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	质荷比 m/z			误差 Error ($\times 10^{-6}$)	分子式 Molecular formula	鉴定结果 Identification result
			实测值 Measured value	理论值 Theoretical value	二级碎片 Secondary fragment			
1	4.33	[M + H] $^+$	149.060 2	149.059 7	103.054 1, 77.038 8	0.2	C ₉ H ₈ O ₂	肉桂酸 Cinnamic acid
2	4.40	[M + H] $^+$	411.190 5	411.191 5	394.188 8, 379.165 2	0.7	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	马钱子碱-N-氧化物 Brucine-N-oxide
3	4.41	[M + H] $^+$	335.175 4	335.175 4	335.175 7	0	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	土的宁 Strychnine
4	4.46	[M + H] $^+$	365.185 5	365.185 9	337.155 2	0.8	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	可鲁勃林 Colubrine
5	4.52	[M + H] $^+$	381.182 6	381.180 9	395.196 8	1.6	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	番木鳖次碱 Vomicine
6	5.99	[M + H] $^+$	171.032 1	171.028 8	127.038 2	2.3	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 Gallic acid
7	7.14	[M + H] $^+$	377.150 0	377.144 2	215.091 3	1.0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸 Loganic acid
8	7.35	[M + H] $^+$	351.178 5	351.170 3	271.260 9	1.2	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	土的宁-N-氧化物 Strychnine-N-oxide

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	t_R (min)	离子模式 Ion mode	质荷比 m/z			误差 Error ($\times 10^{-6}$)	分子式 Molecular formula	鉴定结果 Identification result
			实测值 Measured value	理论值 Theoretical value	二级碎片 Secondary fragment			
9	7.36	$[M+H]^+$	395.204 3	395.196 5	379.164 9	3.9	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	马钱子碱 Brucine
10	8.41	$[M+H]^+$	409.175 7	409.175 8	391.164 3	0.6	$C_{23}H_{24}N_2O_5$	5-O-马钱子碱 5-O-Brucine
11	9.47	$[M+H]^+$	365.139 1	365.149 6	347.139 4, 329.128 0	1.3	$C_{21}H_{20}N_2O_4$	5-O-伪土的宁 5-O-Pseudo-strychnine
12	10.08	$[M+H]^+$	425.214 8	425.207 1	368.147 3	2.2	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	马钱子新碱 Novacine

表 5 移行性成分代谢产物鉴定结果

Table 5 Identification results of metabolites of migratory components

移行性成分 Migratory component	代谢产物保留时间 t_R of metabolite (min)	代谢过程 Metabolic process	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	得分 Score
肉桂酸 Cinnamic acid	1.04	脱去 CH_2O 、 CH_2 以及去甲基化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 4	79.2
	1.10	脱去 O 以及甲基化	$C_{10}H_{10}O$	147.076 6	75.0
	1.97	氧化	$C_9H_8O_3$	165.055 6	73.3
	1.97	脱去羧亚甲基	C_8H_6O	119.049 8	73.6
	1.99	去饱和	$C_9H_6O_2$	147.044 6	74.2
	4.26	脱去 H_2O	C_9H_6O	131.049 9	83.3
	6.83	脱去 CH_2O	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	395.204 7	89.6
	6.83	脱去 CH_2O 、 CH_2O 以及去甲基化	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.178 4	76.3
	8.04	形成酮	$C_{24}H_{24}N_2O_7$	453.168 0	73.6
	8.06	脱去 CH_2O 以及 <i>N</i> -乙酰化	$C_{25}H_{28}N_2O_5$	437.194 6	73.9
马钱子碱- <i>N</i> -氧化物 Brucine- <i>N</i> -oxide	8.06	脱去 CH_2 以及二氢化	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	415.212 2	75.2
	1.23	脱去 H_2O	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.4
	1.23	脱去 CH_2O 、 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 4	79.2
	4.99	脱去 CH_2O 、 CH_2O 以及亚砷制硫醚	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	335.176 1	75.0
	8.26	脱去 CH_2O 、 CH_2O 以及二氢化	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.188 9	70.9
	8.65	脱去 CH_2O 、 CH_2O	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.178 8	75.8
	8.67	亚砷制硫醚	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	395.205 0	76.9
	9.87	二氢化	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	415.212 7	75.8
	10.11	甲基化	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	425.215 6	77.5
	土的宁 Strychnine	1.23	二氧化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 9
8.48		氧化	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.178 9	75.6
可鲁勃林 Colubrine	1.20	脱去 CH_2 以及氧化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 0	78.8
	1.21	脱去 CH_2 以及 <i>N</i> -乙酰化	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.4
	5.27	脱去 CH_2O	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	335.176 3	83.4
	8.26	脱去 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.179 0	75.6

续表 5 (Continued Tab. 5)

移行性成分 Migratory component	代谢产物保留时间 t_R of metabolite (min)	代谢过程 Metabolic process	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	得分 Score	
可鲁勃林 Colubrine	8.26	氧化和甲基化	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	395.205 2	76.7	
	8.26	脱去 CH_2 以及二氢化	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.188 9	70.9	
番木鳖次碱 Vomicine	1.25	脱去 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 4	79.3	
	1.27	脱去 O、 CH_2 以及 N-乙酰化	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.175 4	70.0	
	5.82	脱去 O 和羟亚甲基	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	335.175 7	75.5	
	7.36	甲基化	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	395.205 1	76.8	
	7.36	脱去 O、 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.179 0	75.6	
没食子酸 Gallic acid	8.14	脱去 O、 CH_2 以及二氢化	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.188 3	70.3	
	2.00	脱去 2 O 以及亚砷制硫醚	$C_7H_6O_2$	123.044 7	73.7	
	2.03	三氧化	$C_7H_6O_8$	219.018 9	75.7	
马钱苷酸 Loganic acid	1.23	脱去 $C_6H_{10}O_5$ 以及乙基醇化	$C_8H_{10}O_6$	203.053 6	73.0	
	7.31	脱去 $C_6H_{10}O_5$ 以及硝基还原	$C_{10}H_{16}O_3$	185.115 9	72.8	
土的宁-N-氧化物 Strychnine-N-oxide	1.23	N-乙酰化	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.4	
	1.23	氧化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 4	79.2	
	4.99	脱去 O	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	335.176 1	82.8	
马钱子碱 Brucine	1.20	脱去 2 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 0	78.8	
	1.21	去饱和	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.5	
	5.82	脱去 2 CH_2O	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	335.175 7	83.3	
	8.14	脱去 CH_2O 、 CH_2 以及二氢化	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.188 3	70.3	
	8.26	脱去 CH_2O 、 CH_2	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.179 0	79.8	
	9.33	N-乙酰化	$C_{25}H_{28}N_2O_5$	437.194 6	73.9	
	10.72	氧化和甲基化	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	425.215 9	77.2	
	5-O-马钱子碱 5-O-Brucine	1.07	脱去 CH_2 以及乙基醇化	$C_{20}H_{18}N_2O_6$	383.116 7	78.1
		1.20	脱去 2 CH_2O 以及内部水解	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 0	78.8
1.21		亚砷制硫醚	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.5	
6.81		脱去 CH_2 、 H_2O	$C_{22}H_{20}N_2O_4$	377.148 8	75.0	
5-O-伪土的宁 5-O-Pseudo-strychnine	1.08	氢化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.158 5	78.2	
马钱子新碱 Novacine	1.21	脱去 CH_2 、 H_2O	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	393.174 9	79.5	
	1.24	脱去 CH_2O 、 CH_2 以及去甲基化	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	367.159 2	79.0	
	1.93	脱甲基生成羧酸	$C_{24}H_{26}N_2O_7$	455.189 7	78.1	
	8.26	脱去 CH_2O	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	395.205 2	80.6	
	8.26	脱去 2 CH_2O 以及去甲基化	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	351.179 0	75.6	
	9.32	脱去 CH_2 以及二氢化	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	415.212 7	75.8	
	9.33	脱去 CH_2O 以及 N-乙酰化	$C_{25}H_{28}N_2O_5$	437.194 6	73.9	
	9.33	形成酮	$C_{24}H_{24}N_2O_7$	453.168 3	73.4	

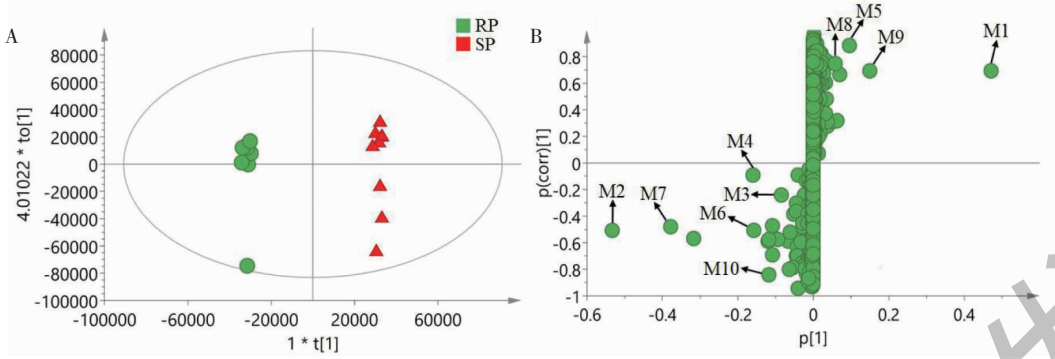


图1 不同灌胃组大鼠血浆差异性分析的得分图(A)和S-plot图(B)

Fig. 1 Score chart (A) and S-plot chart (A) of plasma difference analysis of rats in different gavage groups

表6 砂烫组和生品组灌胃后血浆中差异性成分鉴定结果

Table 6 Identification results of differential components in plasma after gastric lavage between raw group and sand hot group

差异性成分 Differential component	平均响应强度 Average response strength (cps)	
	砂烫组 SP	生品组 RP
土的宁 Strychnine	4 527	761
土的宁-N-氧化物 Strychnine-N-oxide	3 916	234
马钱苷酸 Loganic acid	2 728	8 291
马钱子碱-N-氧化物 Brucine-N-oxide	1 732	149
绿原酸 Chlorogenic acid	759	2 870
毛柳苷 Salidroside	4 186	1 547
可鲁勃林 Colubrine	3 350	1 725
4-羟基番木鳖碱 4-Hydroxy-strychnine	2 858	436
降马枯星碱 B Normacusine B	1 972	405
肉桂酸 Cinnamic acid	158	1 753

2.5 代谢轮廓分析

经 OSI-SMMS 和 Notepad 软件处理高分辨质谱数据,后导入 SIMCA-P 软件,采用 PCA、PLS-DA 分析马钱子炮制前后代谢谱变化(见图2)。在主成分

分析中,PC1 与 PC2 的占比分别达到了 69.13% 和 47.22%,累积贡献率达到了 86.17%,证实了实验的可靠性与重复性。在 PLS-DA 分析中, R^2X 为 0.831, R^2Y 为 0.948, Q^2 为 0.932,说明模型构建良

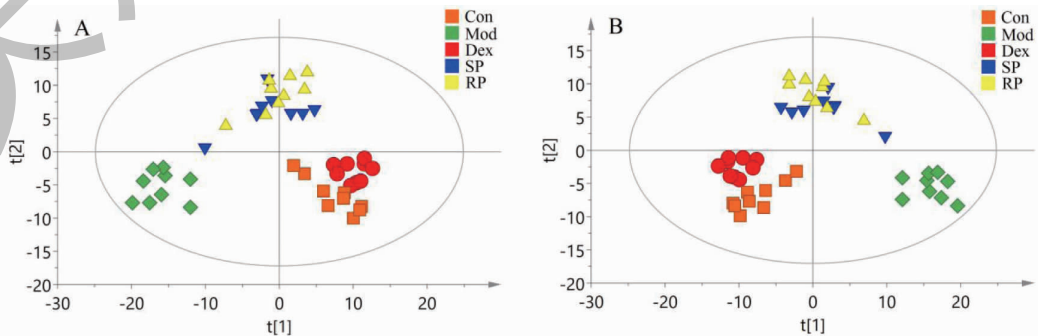


图2 不同样品组大鼠整体代谢物轮廓的PCA得分图(A)及PLS-DA得分图(B)

Fig. 2 PCA score chart(A) and PLS-DA score chart(B) of overall metabolite profiles in different sample groups of rats

好,预测性可靠,该模型可用于差异代谢物分析。研究结果显示空白组与模型组数据点区分明显,表明大鼠蛋清性足跖肿胀炎症模型成立,生品组和砂烫组正好处于正常组和模型组之间,说明灌胃生品、砂烫品后,血浆中内源性代谢物的有一定回调,表明生品和砂烫品确有一定的抗炎效果,而地塞米松组则完全靠近空白对照组,说明地塞米松的治疗效果最好,能有效调节机体炎症所引起的代谢紊乱。

2.6 代谢通路分析

将差异性代谢物鉴定结果输入 MetaboAnalyst

3.0 在线分析系统,构建代谢通路,筛选出主要靶标路径。结果显示(见表7、图3),软件共匹配到差异性代谢产物共43个,富集到了32个代谢通路,利用代谢拓扑分析筛选变化显著的代谢通路,其中具有重要调控意义的代谢通路(pathway impact > 0.1)共9个,主要涉及谷氨酰胺和谷氨酸循环、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、苯丙氨酸代谢、硫代谢、甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、酪氨酸代谢、甘油酯代谢,代谢通路见图4。采用SIMCA-P软件的PLS-DA统计

表7 马钱子炮制干预炎症相关代谢通路分析

Table 7 Analysis of Strychnine Semen processing intervention on inflammatory related metabolic pathways

编号 No.	通路名称 Pathway name	匹配情况 Matching situation	P 值 P value	影响值 Impact value *
P1	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 D-Glutamine and D-glutamate metabolism	2/5	0.23	1.00
P2	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 Biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan	1/4	0.19	0.50
P3	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	1/9	0.37	0.40
P4	硫代谢 Sulfur metabolism	1/5	0.23	0.30
P5	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism	2/24	0.72	0.25
P6	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	2/30	0.46	0.18
P7	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	3/44	0.39	0.12
P8	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	1/42	0.89	0.11
P9	甘油酯代谢 Glycerol metabolism	1/18	0.61	0.10

注: * 影响值大于0.1的代谢通路。

Note: * Metabolic pathways with an impact value greater than 0.1.

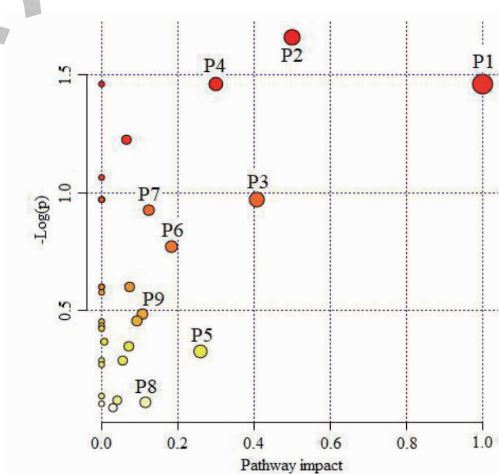


图3 差异性生物标志物的代谢通路富集分析

Fig. 3 Analysis of metabolic pathway enrichment of differential biomarkers

模型中变量差异贡献度值 (variable importance for the projection, VIP) ($VIP > 1, P < 0.05$) 对潜在的生物标志物进行筛选。由结果 (见表 8) 可以看出, 马

钱子炮制品干预炎症后可以显著回调潜在生物标志物的含量, 表明可以通过对以上代谢路径的调节而达到抗炎的治疗效果。

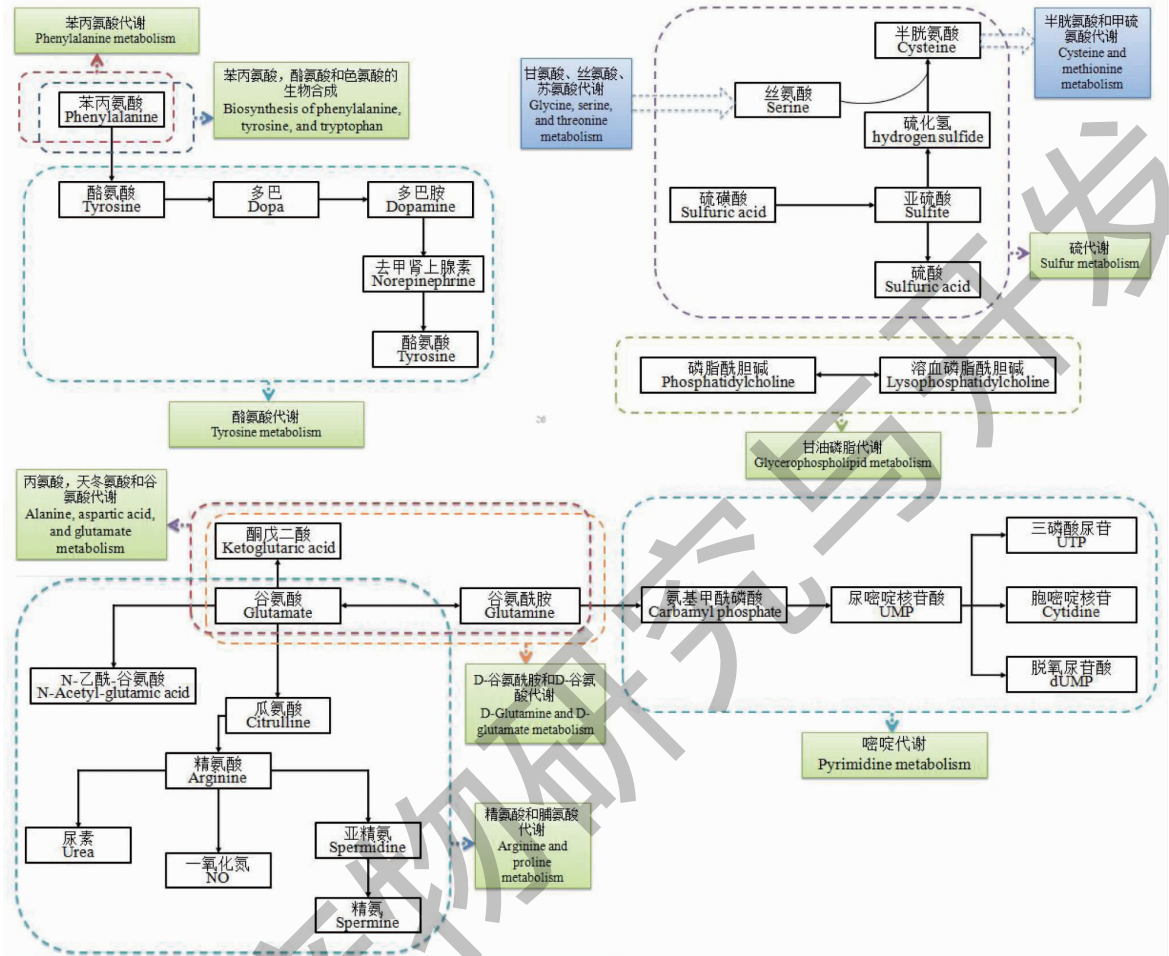


图 4 炮制干预炎症的差异化生物标志物代谢网络图

Fig. 4 Metabolic network diagram of differential biomarkers for processing intervention in inflammation

表 8 不同样品组大鼠比较血浆差异代谢物的相对丰度及变化趋势

Table 8 Comparison of relative abundance and trend of plasma differential metabolites in different sample groups of rats

代谢物名称 Metabolite name	<i>P</i>	VIP	Con	Mod	RP	SP
磷脂酰胆碱 Phosphatidylcholine	3.1E-15	1.42	118.6	180.6 ↑	143.3 ↓	117.7 ↓
磷脂酰乙醇胺 Phosphatidylethanolamine	5.24E-15	1.30	310.3	412.2 ↑	391.9 ↓	293.9 ↓
甘油三酯 Triglyceride	1.483E-11	1.17	60.0	91.6 ↑	82.5 ↓	51.5 ↓
多巴 Dopa	2.236E-10	1.13	30.1	66.8 ↑	42.3 ↓	27.1 ↓
硫酸 Sulfuric acid	5.468E-05	1.12	11.9	23.8 ↑	15.4 ↓	13.8 ↓
谷氨酸 Glutamate	5.571E-04	1.01	24.3	48.4 ↑	45.5 ↓	27.3 ↓

续表 8(Continued Tab. 8)

代谢物名称 Metabolite name	<i>P</i>	VIP	Con	Mod	RP	SP
谷氨酰胺 Glutamine	4.311E-08	1.11	27.3	25.8 ↓	60.6 ↑	70.6 ↑
瓜氨酸 Citrulline	4.374 E-03	1.03	123.2	99.0 ↓	121.3 ↑	103.3 ↑
N-乙酰基-L-谷氨酸 N-Acetyl-L-glutamic acid	9.647E-09	1.23	23.0	79.2 ↑	34.0 ↓	72.1 ↓
苯丙氨酸 Phenylalanine	3.658E-15	1.08	3919.8	5115.3 ↑	4765.2 ↓	3430.8 ↓

注: ↑为相对丰度上调, ↓为相对丰度下调。

Note: ↑ Upregulation of relative abundance, ↓ reduction of relative abundance.

3 讨论与结论

初步毒性实验表明,高剂量下砂烫组的死亡率要显著低于生品组,提示马钱子经过高温炮制后,其毒性确有明显降低。足跖肿胀率实验表明,高剂量下生品组和砂烫组的肿胀率均有显著降低,证明生品和砂烫品确有一定的抗炎作用。而砂烫组与生品组的肿胀率无统计学差异,表明炮制前后抗炎疗效无显著改变。炎症因子的检测结果与肿胀率实验大致相同。马钱子炮制方法较多,包括砂烫、油炸、清炒、爆压、烘烤、微波、煮制等,大多数炮制过程都有加热步骤,一般认为加热会降低主要毒性成分马钱子碱和土的宁含量,而治疗效果更好的异土的宁、异马钱子碱、土的宁氮氧化物和马钱子碱氮氧化物含量则会升高^[9-11]。刘君等认为加热炮制是生物碱分解及氧化反应的结果,并采用 H₂O₂ 进行了验证^[12]。本研究通过初步毒性实验和药效学实验,进一步证实砂烫炮制可降低马钱子毒性,且能保留一定的抗炎治疗效果。

通过血浆代谢产物研究发现,含药血浆中鉴定出的生物碱占到移行成分的 77%,表明起抗炎作用的应多为生物碱类;在移行性成分中鉴定出了疗效更佳、毒性更小的氮氧化物,符合以往研究对马钱子炮制机理的探讨^[13,14]。鉴定出的 60 个代谢产物中仅有 7 个发生了 II 相反应,表明这些移行成分经过 I 相反应后就容易被体内清除。通过含药血浆差异分析发现,鉴定结果中生物碱占大多数,且砂烫组的物质质量要明显高于生品组;同样在砂烫组中也鉴定出了马钱子碱和土的宁的氮氧化物;在差异性分析中仅鉴定出了土的宁,据文献报道土的宁的药理强度为马钱子碱的 40 倍^[15];上述结果佐证了炮制品的抗炎治疗效果应不低于生品。差异性分析中还鉴定出了 3 种有机酸,砂烫组的物质质量均低于生品组,

这可能与有机酸类成分在高温下容易分解有关^[16,17]。上述血浆药物化学研究为明确马钱子炮制品体内起效物质基础提供了数据参考。

通过代谢组学研究发现,除地塞米松组外,马钱子砂烫组的代谢轮廓与正常组最为接近,表明炮制品对炎症引起的体内代谢紊乱有较好的调节作用。生物标志物解析证明马钱子炮制品抗炎作用机制主要与氨基酸代谢和脂质代谢相关。肝脏是动物体内氨基酸代谢的主要器官,肝脏受损可引起代谢紊乱及功能障碍。肝细胞内氨基酸代谢降低,会导致血中氨基酸浓度增高,从而影响到血液、尿液和胆汁中氨基酸的水平变化^[18-20]。谷氨酸是重要的兴奋性神经递质,谷氨酸代谢紊乱,则“谷氨酸-谷氨酰胺循环”被破坏,谷氨酸在细胞外液中浓度过高,会激活过多的兴奋性氨基酸,产生毒性反应。谷氨酰胺是合成 α-酮戊二酸的重要原料,α-酮戊二酸可以在一定程度上降低应激状态中炎症因子的水平,在炎症模型造模后会造成组织中谷氨酸代谢紊乱,产生毒性效应^[21-23]。实验结果表明,砂烫组血浆中谷氨酸含量明显降低,从而降低了脑神经兴奋性,起到镇静作用,同时上调谷氨酰胺含量以达到抗炎的治疗效果。苯丙氨酸主要在肝脏等组织经代谢生成酪氨酸,继而在神经系统和肾上腺髓质合成如多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素等^[24,25]。苯丙氨酸代谢状态将直接影响到机体的生长发育和正常生理机能。本研究结果表明苯丙氨酸在正常组大幅上调,而生品组和砂烫组则小幅下调,砂烫组与正常组较为接近,表明砂烫组能较好调节炎症所引起的苯丙氨酸代谢紊乱。瓜氨酸产生于精氨酸和脯氨酸代谢途径之中,在相应酶的作用下生成精氨酸、鸟氨酸等,可有效降低血氨水平,避免对机体器官损害,减轻体内痛症反应^[26,27]。模型组中瓜氨酸含量相较于正常组有明显下调,而生品组、砂烫组均上调,表明砂烫品

能有效调节精氨酸代谢,舒张血管以减轻炎症带来的疼痛。酪氨酸主要经过酪氨酸氢化酶代谢生成二羟苯丙氨酸,然后在酪氨酸羟化酶作用下转变为多巴以及其它交感神经递质。大鼠蛋清性足趾肿胀炎症模型会造成局部血流量迅速减少,产生炎症反应的同时也伴随疼痛,痛敏反应会逐渐增加^[28,29]。多巴含量在模型组中上调,而在砂烫组中则明显下调,表明砂烫品可能通过调节多巴胺代谢来减少痛敏反应。甘油磷脂代谢为马钱子肝毒性及炮制减毒的关键代谢通路。甘油磷脂代谢中涉及到2个关键作用靶点,即磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺,这两种物质之间可以相互转化,主要在肝脏组织完成。以往研究表明马钱子导致的肝损伤能够引起脂质代谢紊乱,涉及到甘油酯、酰基甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱等物质,以及相关炎症因子水平的变化^[30]。磷脂酰胆碱具有抗炎、增强免疫作用,其抗炎作用及潜在治疗作用可能与减少嗜中性白细胞诱导的微循环炎症反应有关;溶血磷脂酰胆碱是磷脂酰胆碱的产物或代谢物,分布于肝外组织的血浆库中,能诱发多种促炎反应。根据实验结果,模型组中的磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱含量均上调,而生品组和砂烫组均降低,且接近正常组,表明马钱子提取物能有效调节磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱水平,以恢复平衡。甘油磷脂在体内合成最活跃的部位是肝脏,这在一定程度上印证了马钱子肝毒性的客观存在^[31-33];同时也印证了马钱子砂烫品具有较好的抗炎和解毒效果。

综上,本研究采用代谢组学的方法,确证马钱子经砂烫炮制后其毒性降低且仍保留较好的抗炎治疗作用,其体内起效物质应多为生物碱类;马钱子的抗炎、镇痛作用及肝肾、神经毒性与谷氨酰胺-谷氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、硫代谢、甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等通路紊乱密切相关。该研究结果为含生物碱的有毒类中药材炮制减毒增效或存效机制探讨提供了有益的科学参考。

参考文献

- Gao X, Cao XL. Research progress and application of *Strychnos nux-vomica* processing [J]. J Sichuan Tradit Chin Med (四川中医), 2021, 39: 219-222.
- Qin WH, Yang Y, Li Q, et al. Qualitative study on chemical constituents of sand stir-baked *Strychni Semen* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2019, 30: 362-369.
- Qin WH, Yang Y, Li Q, et al. Study on the chemical difference between raw semen *strychni* and frying *Semen Strychni* based on plant metabolomics [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 240-249.
- Li X. Research progress of different processing methods of *Strychnos nux-vomica* [J]. J China Prescript Drug (中国处方药), 2021, 19: 25-27.
- Zhen LL, Nie JH, Zhao FC, et al. Optimization of processing technology of traditional milk-made *Ma Qianzi* (*Nux Vomica*) based on Box-Behnken test design [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报), 2020, 26: 45-48.
- Den ZJ, Liu RX, Hong B, et al. The analgesic mechanism of the active ingredient of *Ma Qianzi* based on network pharmacology [J]. J Trop Med (热带医学杂志), 2020, 20: 731-734.
- Shi X, Yang Y, Qin WH, et al. Metabolomic analysis of the changes of pathways in immunosuppressive mechanism caused by cyclophosphamide in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2017, 25: 539-543.
- Li BL, Lu X, Li JC, et al. Serum metabolic changes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2017, 25: 218-224.
- Lu YH, Gao LY. Research progress on pharmacological activities of *Strychnos nux-vomica* L. and methods of synergism and attenuation [J]. Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志), 2019, 53: 93-97.
- Guo P, Li XY, Zhang B, et al. Research progress on toxicity and attenuated synergies by pharmaceutics technology of *Strychnos* [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报), 2018, 37: 192-197.
- Ren JJ, Zhang XS, Chu ZJ. Research of decreasing toxicity and increasing efficacy on *Semen Strychni* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2016, 18: 221-224.
- Liu J, Zhang HZ. Research survey of attenuation synergy of *Nux Vomica* [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med (实用中医内科杂志), 2015, 29: 159-163.
- Xu M, Zhang J, Qiu JP, et al. Research progress on processing methods and pharmacological effects of traditional Chinese medicine *Ma Qianzi* (*Semen Strychni*) [J]. J Chin Med (中医学报), 2022, 37: 765-772.
- Yang SL, Yang Y. A study on the attenuation method for toxicity of *ma qianzi* [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2017, 9: 43-44.
- Tan LP, Yang K, Zen CH. Advances in research on processing methods of *Strychni Semen* [J]. Modern Chin Med (中国

- 现代中药),2018,20:906-909.
- 16 Liu XY, Chen XL, Du LJ, et al. The Interaction of various factors leads to rapid degradation of chlorogenic acid in roasted coffee beans during processing [J]. Food Sci (食品科学), 2021, 42: 7-14.
 - 17 Guo SQ. Application development and progress in synthesis technology of cinnamic acid [J]. Shanghai Chem Ind (上海化工), 2002, 27: 32-34.
 - 18 Mathew AV, Jaiswal M, Ang L, et al. Impaired amino acid and TCA metabolism and cardiovascular autonomic neuropathy progression in type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2019, 68: 2035-2044.
 - 19 Hassing EJ, de Groot PA, Marquenie VR, et al. Connecting central carbon and aromatic amino acid metabolisms to improve de novo 2-phenylethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng, 2019, 28: 165-180.
 - 20 Tabe Y, Lorenzi PL, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy [J]. Blood, 2019, 134: 1014-1023.
 - 21 Øvrehus M A, Bruheim P, Ju W, et al. Gene expression studies and targeted metabolomics reveal disturbed serine, methionine, and tyrosine metabolism in early hypertensive nephrosclerosis [J]. Kidney Int Rep, 2019, 4: 321-333.
 - 22 Liu XY, Chen XY, Zhong DF. Metabolism and pharmacokinetics of covalent tyrosine kinase inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2019, 54: 432-439.
 - 23 Bryant JE, Fr? lich M, Tran S, et al. Ketamine induced changes in regional cerebral blood flow, interregional connectivity patterns, and glutamate metabolism [J]. J Psychiatr Res, 2019, 117: 108-115.
 - 24 Wei DD, Duan JA, Su SL, et al. Extracts from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* ameliorate gut dysfunction by a fecal metabolomic approach [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 3084-3093.
 - 25 Yu LM, Liu QS, Zhao KJ, et al. Fecal metabolic profiling in a murine model of irritable bowel syndrome and the intervention role of prepared *Atractylodes macrocephala* [J]. Chin J Integr Tradit Western Med (中国中西医结合杂志), 2019, 39: 708-715.
 - 26 Seim GL, Britt EC, Fan J. Analysis of arginine metabolism using LC-MS and isotopic labeling [J]. Methods Mol Biol, 2019, 19: 199-217.
 - 27 Zhang LL, Wang YX, Kong YL, et al. Effects of supplement of arginine on anti-oxidation and arginine metabolism in intrauterine growth retardation piglets [J]. J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报), 2017, 40: 1111-1118.
 - 28 Takahashi H, Yokoi N, Seino S. Glutamate as intracellular and extracellular signals in pancreatic islet functions [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2019, 95: 246-260.
 - 29 Zhang M, Liu GL, Li XL, et al. Effect of adding hawthorn and astragalus mixtures on the plasma metabolome of perinatal dairy cows [J]. Bio Technol Bull (生物技术通报), 2019, 35: 127-137.
 - 30 Jia XX, Li W, Li JS, et al. Progressive studies on toxicity of *Strychnos nuxvomica* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 2396-2399.
 - 31 Pan YC, Sun DY, Cao L. Progress of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 in diseases [J]. Chem Life (生命的化学), 2017, 37: 930-934.
 - 32 Li ZH, Zhang L, Zhao HW, et al. Study on the diuresis mechanism of Radix Scrophulariae on rats with spleen deficiency and water dampness based on serum metabolomics [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2018, 20: 1381-1392.
 - 33 Zhang L, Li ZH, Zhao HW, et al. Impact of extracts of xuan-shenon liver metabolome in rat model of hyperthyroidism [J]. J Beijing Univ TCM (北京中医药大学学报), 2019, 42: 21-29.

(上接第 880 页)

- 21 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading [J]. Semin Cancer Biol, 2005, 15: 300-308.
- 22 Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. Nature, 2008, 452: 230-233.
- 23 Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis [J]. Cell, 2006, 126: 107-120.
- 24 Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression [J]. Cancer Res, 2004, 64: 2627-2633.
- 25 Zhang C, Liu J, Wu R, et al. Tumor suppressor p53 negatively regulates glycolysis stimulated by hypoxia through its target RRAD [J]. Oncotarget, 2014, 5: 5535-5546.