达菲干预肾阳虚外感小鼠的血清代谢组学研究^{*}付业佩, 孙启慧, 李灿, 丁富娟, 巩丽丽, 杨勇, 容蓉^{**}

(山东中医药大学, 济南 250355)

摘要 目的: 通过血清代谢组学的方法, 采用 LC-MS 技术, 在正负离子模式下, 研究达菲对肾阳虚外感小鼠的干预作用, 初步探索达菲在流感治疗过程中调控的代谢通路。方法: 36 只昆明小鼠随机分为正常组、模型组、达菲组, 腹腔注射苯甲酸雌二醇方法复制肾阳虚小鼠模型, 然后通过滴鼻感染方法建立病证结合的肾阳虚小鼠外感模型, 达菲组以 $9.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给药干预, 每天 1 次, 连续 6 d, 其他组给予等量的生理盐水; 末次给药 24 h 后取小鼠血清, 并进行原始数据采集和相关统计学分析。结果: 达菲组小鼠体质量、肛温相对于模型组均有回升趋势; 血清样品经过数据分析, 最终鉴定了 22 个存在显著性差异的生物标志物, 正离子模式下 8 个, 负离子模式下 14 个, 包括氨基酸类、甘油磷脂类、激素类以及花生四烯酸等物质, 以上物质经达菲干预后均出现不同程度的回调。结论: 达菲对肾阳虚外感小鼠具有一定干预作用, 在干预过程中对甘油磷脂代谢、视黄醇代谢、能量代谢等途径具有一定的调控作用。

关键词: 液相色谱-质谱; 代谢组学; 达菲; 肾阳虚外感

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 05-0821-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.08

Study of serum metabolomics in tamiflu intervention
kidney-yang deficiency syndrome mouse model
infected with influenza virus A^{*}

FU Ye-pei, SUN Qi-hui, LI Can, DING Fu-juan, GONG Li-li,
YANG Yong, RONG Rong^{**}

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract Objective: To study the intervention effect of tamiflu on kidney-yang deficiency syndrome mouse model infected with influenza virus A by LC-MS technique in positive and negative ion mode based on serum metabolomics study and explore the metabolic pathways regulated by tamiflu in the course of influenza treatment.

Methods: 36 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, and tamiflu group. The kidney-yang deficiency syndrome mouse model was established by intraperitoneal injection of estradiol benzoate.

^{*} 国家自然科学基金项目 (No.81273626); 国家科技重大专项项目 (No.2014ZX09509001-001); 山东省重点研发计划 (No.2017CXGC1309); 山东省重点产业关键技术创新工程 (No. 2016CYJS08A01-5)

^{**} 通信作者 Tel: (0531) 89628085; E-mail: rosierong@163.com

第一作者 Tel: 18364166926; E-mail: fuyepai0826@163.com

The disease-associated kidney-yang deficiency syndrome mouse model was established by nasal infection with influenza virus A. The tamiflu group were intervened with a dose of $9.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, once a day for 6 days, other two groups were given the same amount of saline. Serum samples were collected from each mouse of the three groups 24 h after the last administration, and the LC-MS original data were collected and statistical analysis were performed. **Results:** Compared with the model group, the body weights and rectal temperature of the tamiflu group tended to increase. Twenty-two biomarkers with significant difference were identified in the serum samples. Eight of them were in positive ion mode and fourteen were in negative ion mode. Levels of the substances such as amino acids, glycerophospholipid, hormones and arachidonic acid were regulated with tamiflu intervention. **Conclusion:** Tamiflu has an intervention effect on kidney-yang deficiency syndrome mouse model infected with influenza virus A and has regulatory effect on glycerophospholipid metabolism, retinol metabolism, energy metabolism during the intervention.

Keywords: LC-MS; metabolomics; tamiflu; kidney-yang deficiency syndrome mice model infected with influenza virus A

流感是由流感病毒引起的急性发热性呼吸道传染病,具有发病率高,传播迅速,多次反复等特点,并且流感临床症状较重,并发症发生率高,严重时会导致死亡,在高危人群(年老体弱、免疫力低下、慢性病患者等)中有更高的发病率和死亡率^[1]。达菲(又称磷酸奥司他韦)作为一种神经氨酸抑制剂,可以在人体内转化成对流感病毒神经氨酸酶有抑制作用的活性代谢物,与流感病毒神经氨酸酶活性位点结合,从而抑制流感病毒颗粒的释放^[2-3],达到治疗流感的目的,临床常用于甲型、乙型流感病毒的治疗。

目前对于达菲的药效以及临床作用研究较多,而基于代谢组学方法研究其作用机制的报道较少。代谢组学主要通过对机体内源性小分子代谢物进行定性定量分析,研究生物体在内、外因素作用下代谢物种类和数目等变化的动态规律及其与生理、病理变化的关联性^[4-5],分析差异代谢物的作用和参与的代谢通路,从而发现药物干预病症的内在机制^[6]。课题组在前期研究工作中,建立了肾阳虚外感小鼠模型^[7],模拟临床上高危人群感染流感的情况。本文拟采用代谢组学的方法,初步探讨达菲用药过程中,特别是对于肾阳虚外感证的干预过程中,对于代谢通路的调控作用,从机体代谢网络调控的角度探索达菲治疗流感的内在作用机制。

1 材料

1.1 动物与药物 昆明小鼠,雄性,体质量(20 ± 2) g, SPF 级,山东鲁抗动物实验中心提供,动物许可

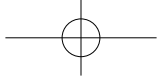
证号为 SCXK(鲁)20080002; 苯甲酸雌二醇,批号 140627,购自宁波第二激素厂, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 流感病毒 H1N1,北京地方株,引自中国 CDC 病毒病研究所,参考文献[8]对 H1N1 病毒进行传代;达菲,购自上海罗氏制药有限公司,批号 B3017。

1.2 仪器与试剂 Thermo Fisher Ulti Mate 3000 液相色谱系统和 Thermo Fisher Q Exactive 高分辨质谱仪(Thermo Fisher 公司);Mettler AE240 电子天平(梅特勒公司);VortexGenie 2 涡旋振荡器(Scientific Industries 公司);高速离心机(Thermo Fisher 公司);SIGMA 低速冷冻离心机(SIGMA 公司, D-37520);BAT-12 微探头温度计(Physitemp Instruments);VMR 小动物麻醉机(Midmark 公司);甲醇、乙腈、甲酸、异丙醇均为色谱纯(Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 模型与给药 36 只昆明小鼠按照体质量及肛温分为 3 组,正常组、模型组和达菲组。基于课题组前期研究基础,首先复制肾阳虚模型小鼠^[7],在此基础上,鼻腔接种 H1N1 流感病毒,建立肾阳虚外感小鼠模型^[9]。达菲组按照人的临床等效剂量 $9.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,正常组、模型组给予等量的生理盐水。每天 1 次,连续给药 6 d。末次给药 24 h 后,通过眼球取血,制备血清存于 -80°C ,备用。

2.2 样品前处理 血清放置至室温,取 $100 \mu\text{L}$ 样品于 EP 管内,加入甲醇 $300 \mu\text{L}$,涡旋 5 min, 4°C 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 微



孔滤膜,备用;从所有待测样品中各取 10 μL 混合,按照上述方法,制备成质控样本。

2.3 液质联用条件 色谱条件: Halo C_{18} 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μm); 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$; 进样室 4 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 A 为 0.05% 甲酸-水溶液, B 为 0.05% 甲酸-乙腈溶液, 梯度洗脱(正离子模式: 0~1 min, 2%B; 1~9 min, 5%B $\rightarrow$ 45%B; 9~15 min, 45%B $\rightarrow$ 100%B; 15~17 min, 100%B; 17~22 min, 100%B $\rightarrow$ 2%B)。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 采用正离子扫描检测; 鞘气流速 45 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流速 10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; 耐热温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾电压 3.5 kV; 毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 质谱分辨率 70 000 FWHM (m/z 200); 扫描方式为全扫描; 质量扫描范围 m/z 80~1 000 [负离子模式下梯度洗脱 (0~3 min, 15%B; 3~10 min, 15%B $\rightarrow$ 45%B; 10~12 min, 45%B $\rightarrow$ 85%B; 12~15 min, 100%B; 15~20 min, 100%B $\rightarrow$ 15%B)。质谱条件为喷雾电压 3.0 kV; 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 其他均与正离子模式相同]。

2.4 数据分析 过分子特征提取采集的数据, 经 MS

convert (64-bit) 软件转换为通用格式 (.mzXML), 然后使用 R 语言、MPP、SIMCA-P 等软件处理数据, 筛选得到 VIP>1 的数据, 再进行 t 检验和方差分析, 选择满足 $P<0.05$ 且 Fold change ≥ 2.0 的化合物作为潜在生物标志物, 并进行无监督的主成分分析 (PCA), 然后使用 HMDB (人类代谢组数据库) 查询生物标志物。分析得到的精确相对分子质量, 结合 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)、METLIN (<http://www.metlin.scripps.edu>) 等数据库, 根据各化合物的二级质谱碎片离子, 对化合物进行结构鉴定, 将鉴定得到的潜在生物标志物进行代谢通路的关联和网络分析。

3 结果

3.1 体质量与肛温 正常组小鼠皮毛光滑, 活泼好动, 精神状态好, 且体质量日益渐增; 模型组小鼠感染病毒后体质量日趋下降, 精神萎靡, 与正常组小鼠有显著差异; 达菲组给药干预后, 对小鼠体质量无明显作用, 但肛温逐渐回升, 且从第 4 天开始具有统计学差异 (见表 1)。

表 1 肺指数、各组小鼠肛温变化

Tab. 1 Lung index and changes in rectal temperature of mice in each group

组别 (group)	肺指数 (lung index)/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	死亡率 (mortality rate)/%	肛温 (rectal temperature) / $^{\circ}\text{C}$					
			第 1 天 (Day 1)	第 2 天 (Day 2)	第 3 天 (Day 3)	第 4 天 (Day 4)	第 5 天 (Day 5)	第 6 天 (Day 6)
正常组 (normal group)	$6.80 \pm 0.51^{**}$	0	36.01 ± 0.29	36.06 ± 0.39	36.77 ± 0.36	36.26 ± 0.15	36.5 ± 0.42	35.77 ± 0.34
模型组 (model group)	18.82 ± 4.23	33.30	35.03 ± 0.72	33.21 ± 1.50	33.01 ± 0.82	33.10 ± 1.19	33.69 ± 0.71	32.67 ± 1.01
达菲组 (tamiflu group)	$15.62 \pm 3.96^{\circ}$	0	35.25 ± 0.56	33.15 ± 1.98	34.22 ± 0.76	$34.52 \pm 0.78^{**}$	$34.64 \pm 0.78^{**}$	$34.28 \pm 0.78^{**}$

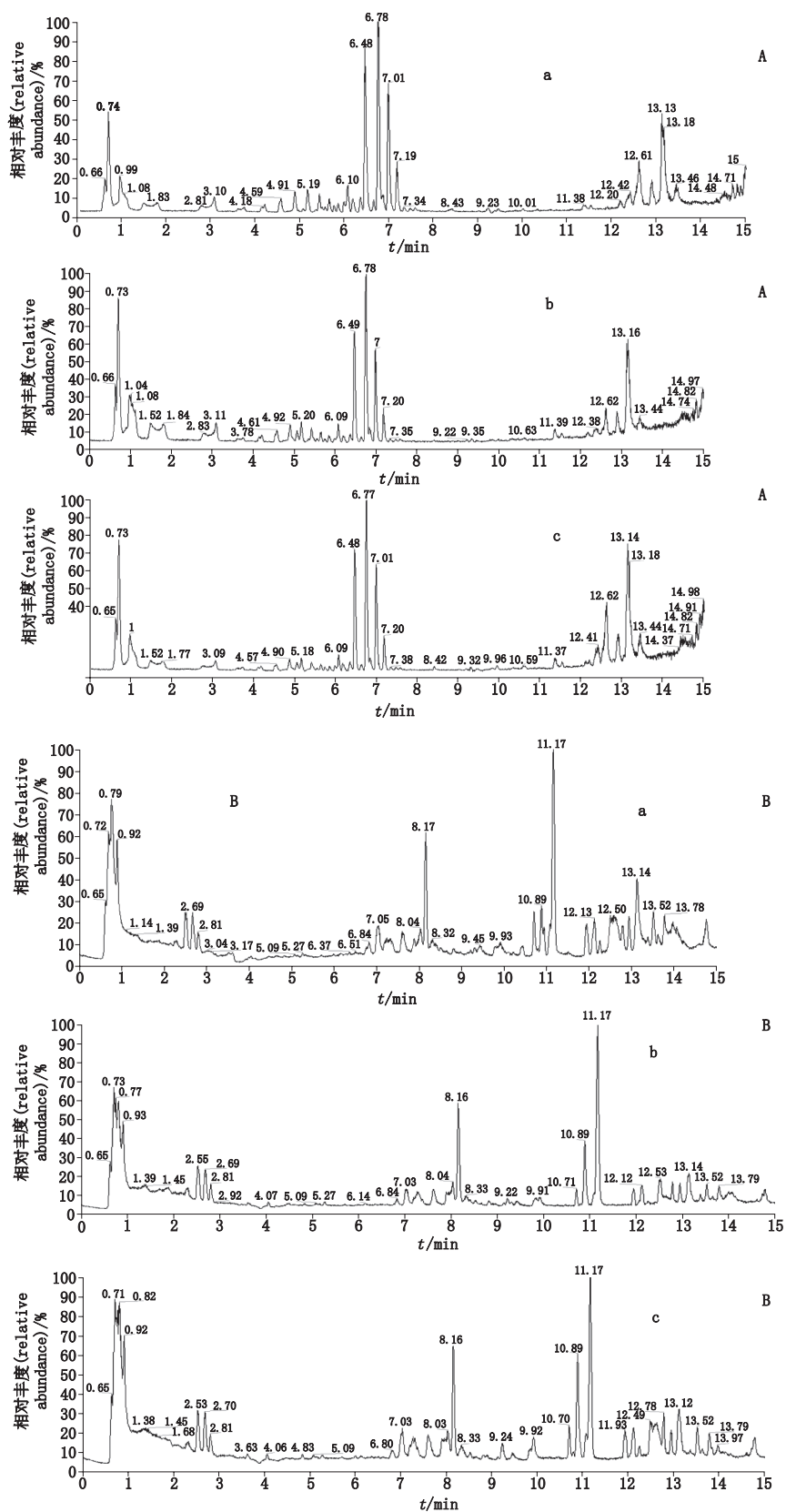
注 (note): 肺指数 = 肺质量 (mg) / 体质量 (g) [lung index = lung mass (mg) / body mass (g)] ; 与模型组相比 (compared with model group), $^{**}P<0.01$, $^{\circ}P<0.05$

3.2 肺指数 流感病毒属于上呼吸道病毒, 主要引起肺部炎症, 肺指数越高, 表明炎症越严重。从表 1 可见, 模型组肺指数高于正常组 ($P<0.01$), 说明模型组小鼠肺部有炎症; 达菲组肺指数低于模型组, 说明给药后肺部炎症减轻 ($P<0.05$)。

3.3 LC-MS 总离子流图 采用 LC-MS 采集各组小鼠血清样本数据, 得到 3 组小鼠正、负离子模式下总离子流图 (TIC), 见图 1。

3.4 模式识别 采集的原始数据经预处理, 然后

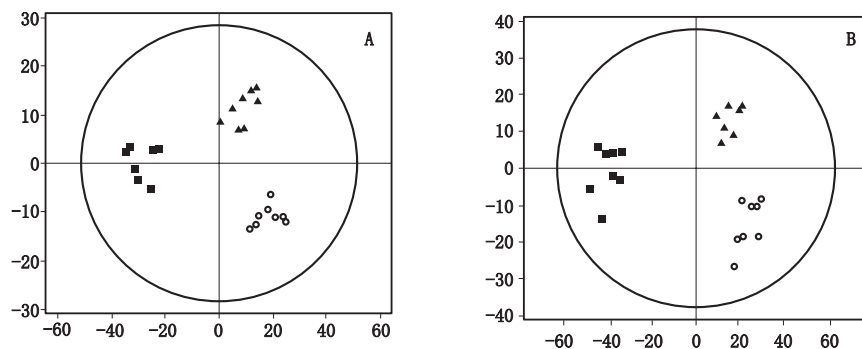
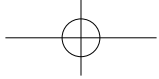
分别采用 PCA 和 PLS-DA 方法对数据进行分析, 结果显示正负离子模式下各组样本在空间上已经达到完全分离。正离子模式 $R^2X=0.588$, $R^2Y=0.98$, $Q^2=0.836$; 负离子模式 $R^2X=0.501$, $R^2Y=0.938$, $Q^2=0.829$, R^2Y 与 $Q^2(\text{cum})$ 之间的差值小于 0.3, 并且 $Q^2(\text{cum})$ 大于 50%, 表明模型的预测能力良好^[10], 故构建的 PLS-DA 模型可信有效, 可进一步分析。见图 2。



a. 正常组 (normal group) b. 模型组 (model group) c. 达菲组 (tamiflu group)

图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the samples under positive (A) and negative (B) ion modes



■ 正常组 (normal group) ○ 模型组 (model group) ▲ 达菲组 (tamiflu group)
A. 正离子模式 (positive ion mode) B. 负离子模式 (negative ion mode)

图2 各组小鼠血清的 PLS-DA 图

Fig. 2 PLS-DA map of mouse serum of each group

3.5 潜在生物标志物的鉴定 通过 PLS-DA 分析得到的 $VIP > 1$ 的数据, 结合 t 检验和 ANOVA 分析 ($P < 0.05$, $FC > 2.0$), 通过物质的精确质荷比及同位素

比例, 在 HMDB、METLIN 和 KEGG 数据库中搜索, 结合其二级碎片信息, 鉴别潜在生物标志物, 具体结果见表 2 和表 3。

表 2 正离子模式下血清差异代谢物

Tab. 2 Serum differential metabolites in positive ion mode

ID	t_R /min	分子式 (molecular formula)	相对分子质量 (relative molecular mass)	化合物 (compound)	代谢通路 (metabolic pathway)	趋势 (trend)
1	0.693 961 5	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	347.06	腺苷单磷酸 (adenosine monophosphate)	丙氨酸代谢 (alanine metabolism)	↑
2	0.695 844 4	$C_6H_{14}N_4O_2$	174.11	D-精氨酸 (D-arginine)	D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢 (D-arginine and D-ornithine metabolism)	↑
3	0.992 888 8	$C_3H_8O_3$	92.05	甘油 (glycerol)	甘油酯代谢 (glycerol metabolism)	↑
4	1.647 839	$C_{10}H_{12}N_4O_6$	284.08	黄嘌呤核苷 (xanthine nucleoside)	嘌呤代谢 (purine metabolism)	↑
5	12.009 388	$C_{21}H_{42}NO_7P$	451.27	LysoPE (0: 0/16: 1)	甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	↑
6	12.614 812	$C_{26}H_{52}NO_7P$	521.35	LysoPC (18: 1)	甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	↑
7	13.446 39	$C_{20}H_{30}O$	286.23	维生素 A (vitamin A)	视黄醇代谢 (retinol metabolism)	↑
8	14.822 82	$C_{42}H_{78}NO_8P$	755.55	PC (18: 2/16: 1)	甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	↓

注 (note): 与模型组相比, 正常组和达菲组标志物的上升与下降趋势 (compared with model group, the markers in normal group and tamiflu group were increased and decreased, respectively)

3.6 潜在标志物结构推导 以正离子模式下 LC-MS/MS 获得的离子 [m/z 175.12 ($t_R=0.69$ min)] 和负离子模式下 LC-MS/MS 获得的离子 [m/z 304.23 ($t_R=10.96$ min)] 为例, 简要介绍潜在生物标志物的结构推导过程。正离子模式下, 在 m/z 174.11 ($t_R=0.69$ min) 处提取二级质谱图 (图 3-A), 显示分子离子峰 [$M+H$] $^+$ 为 175.12, 其特征碎片离子为

m/z 116.07, 参考文献 [11] 推测该化合物可能为精氨酸, 结合二级质谱分析, 推测该化合物裂解方式如图 4 所示; 负离子模式下, 在 m/z 304.23 ($t_R=10.96$ min) 处提取二级质谱图 (见图 3-B), 分子离子峰 [$M-H$] $^-$ 为 304.24, 其特征碎片离子为 m/z 259.24, 参考文献 [12] 推测该化合物为花生四烯酸, 其裂解方式见图 5。

表 3 负离子模式下血清差异代谢物

Tab. 3 Serum differential metabolites in negative ion mode

ID	t_R /min	分子式 (molecular formula)	相对分子质量 (relative molecular mass)	化合物 (compound)	代谢通路 (metabolic pathway)	趋势 (trend)
1	0.772 97	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.06	D- 葡萄糖 (D-glucose)	糖代谢 (carbohydrate metabolism)	↑
2	0.815 632	C ₅ H ₉ NO ₄	147.05	L- 谷氨酸 (L-glutamate)	丙氨酸代谢 (alanine metabolism)	↓
3	0.894 147	C ₃ H ₄ O ₃	88.02	丙酮酸 (pyruvic acid)	柠檬酸循环 (tricarboxylic acid cycle)	↓
4	1.941 887	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	251.10	脱氧腺苷 (deoxy adenosine)	嘌呤代谢 (purine metabolism)	↑
5	2.093 287	C ₉ H ₁₂ O ₄	184.07	Vanylglycol	酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism)	↓
6	3.666 65	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.21	皮质醇 (cortisol)	类固醇激素 (steroid hormones)	↓
7	3.803 857	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.19	醛固酮 (aldosterone)	类固醇激素 (steroid hormones)	↓
8	4.077 102	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	364.23	Dihydrocortisol	类固醇激素 (steroid hormones)	↓
9	6.990 021	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	479.30	LysoPE (0: 0/18 : 1)	甘油 磷 脂 代 谢 (glycerophospholipid metabolism)	↑
10	8.869 075	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	495.33	LysoPC (16 : 0)	甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	↑
11	9.836 408	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.31	甘 草 酸 (甘 氨 胆 酸) [glycyrrhizic acid (glycocholic acid)]	胆汁酸生物合成 (bile acid biosynthesis)	↑
12	9.929 591	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	509.35	LysoPC (17 : 0)	甘油磷脂代谢 (glycerophospholipid metabolism)	↑
13	10.962 62	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.24	花生四烯酸 (arachidonic acid)	花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)	↑
14	11.064 42	C ₂₁ H ₃₄ O ₅	366.24	四氢皮质醇 (tetrahydrocortisol)	类固醇激素 (steroid hormones)	↑

注 (note): 与模型组相比, 正常组和达菲组标志物的上升与下降趋势 (compared with model group, the markers in normal group and tamiflu group were increased and decreased, respectively)

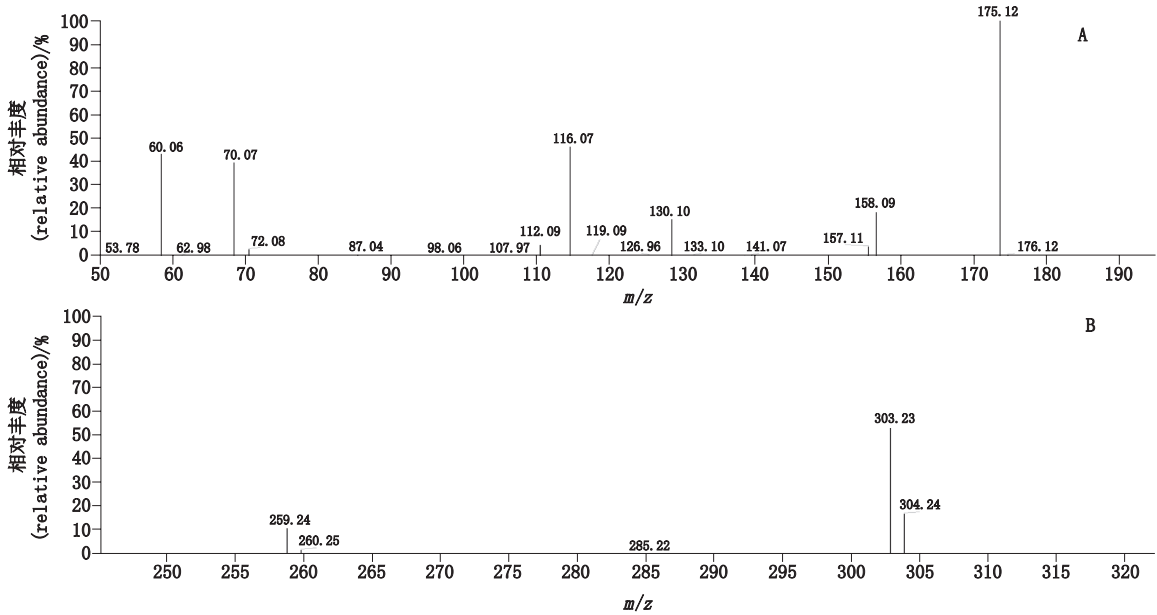
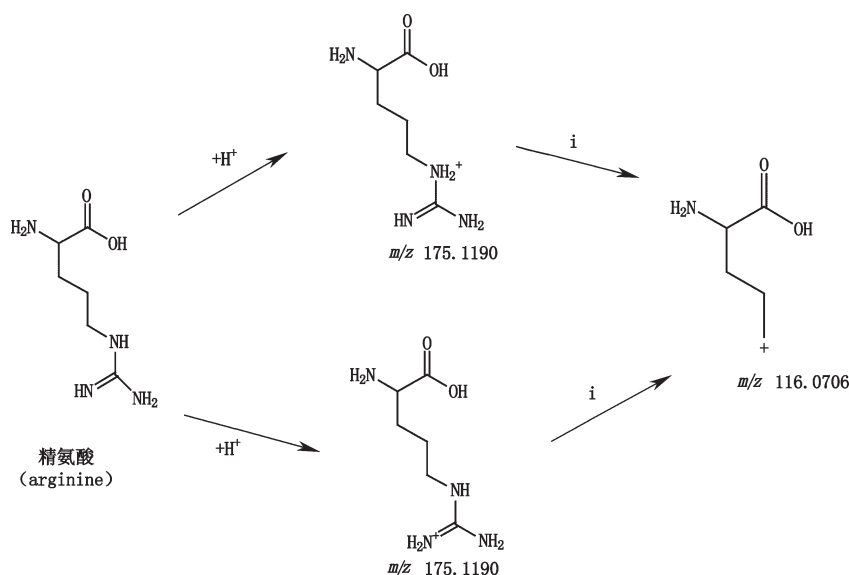
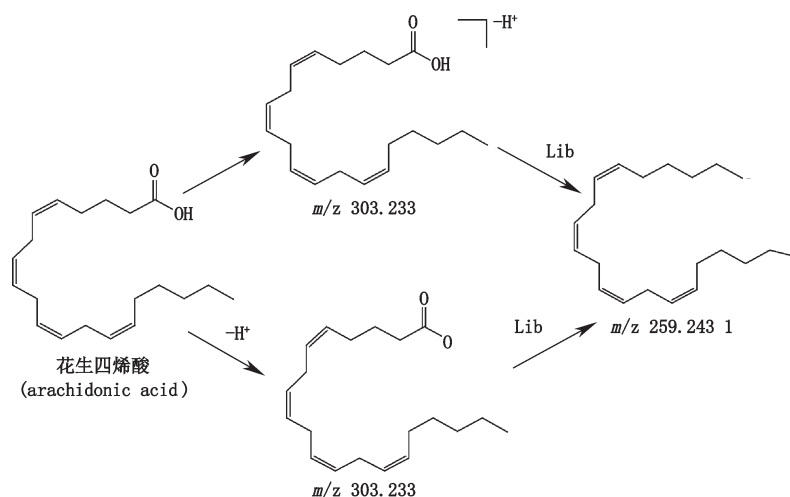


图 3 正 (A)、负 (B) 离子模式下提取二级质谱图

Fig. 3 Extraction of secondary mass spectrum in positive (A) and negative (B) ion modes

图4 正离子模式下 m/z 175.12 ($t_R=0.69$ min) 裂解方式Fig. 4 m/z 175.12 ($t_R=0.69$ min) cracking mode in positive ion mode图5 负离子模式下提取 m/z 304.23 ($t_R=10.96$ min) 裂解方式Fig. 5 m/z 304.23 ($t_R=10.96$ min) cracking mode in negative ion mode

4 讨论

在课题组前期工作中,开展了达菲、《伤寒论》经方-麻黄细辛附子汤以及中成药连花清瘟胶囊对于肾阳虚外感小鼠干预作用的比较研究,结果发现,达菲药效低于麻黄细辛附子汤,但高于连花清瘟胶囊^[13]。本研究基于代谢组学的方法,考察达菲对于肾阳虚外感小鼠代谢通路的干预作用。在成功复制肾阳虚外感小鼠模型的基础上,采用达菲干预,结果显示给药组小鼠肺指数、死亡率、肛温等各项指标相对于模型组均有明显改善。血清样本采用 LC-MS/MS 分析,数据经统计学分析筛选出 22 个差异性化合物,认为其为潜在的生物标志物;根据高分辨质谱数据

以及二级质谱碎裂的信息,对其进行了初步的定性分析,推测主要为葡萄糖、氨基酸、甘油磷脂类、花生四烯酸等物质,与其相关的代谢通路有 14 条,主要涉及糖代谢、视黄醇代谢、甘油磷脂代谢等。

葡萄糖是机体生命活动所依赖的主要能源物质之一,为机体生命活动提供能量保证。模型组小鼠血清中 *D*-葡萄糖含量显著下降,丙酮酸含量升高;达菲给药后,相对于模型组,这 2 种物质均出现良好的回调。推测病毒感染后模型小鼠机体葡萄糖大量消耗,丙酮酸堆积^[14],能量代谢途径出现异常。给药干预后机体能量代谢有回调趋势。

维生素 A 可增强机体的免疫反应,维生素 A 缺

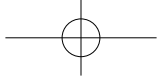
乏会降低机体视黄醇的转运,引起免疫应答异常,还可引起气管、支气管上皮细胞发育受阻,完整性受到破坏^[15-17]。文献报道,精氨酸也参与机体的免疫调节^[18]。本研究发现,模型组维生素 A 及精氨酸含量明显下降,经达菲给药干预后,上述 2 种物质含量趋于正常。故推测在达菲对肾阳虚外感小鼠干预过程中,可以干预与机体免疫功能相关的视黄醇代谢和有关的氨基酸代谢。

甘油磷脂类物质与疾病感染、免疫功能以及多种疾病的发生和发展密切相关^[19]。甘油磷脂是肺泡表面活性物质的重要成分,对肺部感染炎症后进行控制,并且可以保护细胞免受氧化应激而死亡^[20];磷脂酰乙醇胺作为肺泡表面的活性物质,可被磷脂酶 A2 作用转化为溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPE)^[21]。本研究中,模型组甘油磷脂类化合物含量显著下降,给药干预后该类物质呈明显上升趋势,推测达菲在用药过程中,会调控与炎症相关的甘油磷脂类物质代谢通路。

本研究从代谢组学的角度,通过高分辨质谱对差异性代谢物进行了初步分析,推测了达菲干预肾阳虚外感小鼠可能的代谢通路。肾阳虚外感证潜在生物标志物的结构有待于通过对照品对照的方式进一步验证,同时本研究的发现为下一步代谢靶标的定量分析奠定基础。

参考文献

- [1] 刘红,徐瑞芳. 磷酸奥司他韦联合抗病毒口服液治疗甲型 H1N1 流感的临床观察[J]. 中国中医急症, 2017, 26(8): 1474
LIU H, XU RF. Clinical application of oseltamivir phosphate combined with antiviral oral liquid in the treatment of influenza of H1N1[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(8): 1474
- [2] 符晓四,姚学峰. 达菲药物对 H1N1 病毒作用研究[J]. 生物信息学, 2010, 8(4): 371
FU XS, YAO XF. Effect of tamiflu for curing influenza of H1N1[J]. Bioinformatics, 2010, 8(4): 371
- [3] 窦爱华,李侗曾,刘远志,等. 达菲及中药治疗甲型 H1N1 流感的疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(26): 3289
DOU AH, LI TZ, LIU YZ, et al. Curative effect observation of tamiflu and traditional Chinese medicine on type A H1N1 influenza[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2010, 19(26): 3289
- [4] NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181
- [5] NICHOLSON JK, CONNELLY J, LINDON JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 153
- [6] 郭慧,崔扬,王秋红,等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 213
GUO H, CUI Y, WANG QH, et al. Overview on application of metabonomics in research on Chinese medicine compound[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(1): 213
- [7] 吕圭源,苏洁,陈素红,等. 相同性味不同归经中药对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(10): 70
LÜ GY, SU J, CHEN SH, et al. Effects of herbs of same nature and flavor but different meridian tropism on estradiol-induced kidney-yang deficiency in mice[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2011, 45(10): 70
- [8] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 249
GUO YJ, CHENG XW. Influenza Virus and Its Experimental Techniques[M]. Beijing: China Three Gorges Publishing House, 1997: 249
- [9] 孙启慧,相美容,王朋展,等. 麻黄细辛附子汤对正常小鼠外感及肾阳虚模型小鼠外感影响的比较[J]. 中国中医急症, 2015, 24(12): 2072
SUN QH, XIANG MR, WANG PZ, et al. Intervention comparison of Mahuang Xixin Fuzi decoction on influenza virus in normal mice and kidney-yang deficiency mice model[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2015, 24(12): 2072
- [10] 蒋海强,裴磊,李运伦,等. 清热降压机囊干预 SHR 海马区组织代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 134
JIANG HQ, NIE L, LI YL, et al. Effect of qingrejiangya capsule on histologic metabolomics of SHR hippocampus[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(1): 134
- [11] 王一红,冯家力,潘振球,等. 液相色谱-质谱/质谱联用技术分析 18 种游离氨基酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 161
WANG YH, FENG JL, PAN ZQ, et al. The analysis of 18 free amino acids by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(2): 161
- [12] 詹同运,石磊,赵树进,等. HPLC-MS/MS 法检测人血浆中游离花生四烯酸浓度[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 388
ZHAN TY, SHI L, ZHAO SJ, et al. HPLC-MS/MS determination of arachidonic acid in human plasma[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(3): 388
- [13] 侯衍豹. 麻黄细辛附子汤对肾阳虚外感病证的综合药效评价及调控 TLR3-TRIF-NF- κ B 信号通路的作用[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016
HOU YB. The Comprehensive Evaluation on the Efficacy Kidney-yang Deficiency Mice Model Infected with Influenza Virus and The Intervention Effect on TLR3-TRIF-NF- κ B Signaling Pathway of Mahuang Xixin Fuzi Decoction[D]. Jinan: Shandong University of



- Traditional Chinese Medicine, 2016
- [14] 孙启慧, 张静, 李壮壮, 等. 基于代谢组学的麻黄细辛附子汤治疗流感小鼠的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 763
- SUN QH, ZHANG J, LI ZZ, *et al.* Action mechanism of Mahuang Xixin Fuzi decoction for mice with influenza based on metabolomics information[J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(4): 763
- [15] MEDEIROS SR, PINHEIRO-ROSA N, LEMOS L, *et al.* Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4+Foxp3+ LAP+T cells in mice[J]. *Nutrition*, 2015, 31(10): 1260
- [16] 魏文峰, 褚衍涛, 刘烨, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱技术的肺炎支原体感染小鼠血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1382
- WEI WF, CHU YT, LIU Y, *et al.* Serum metabolomics in mice infected with mycoplasma pneumoniae by UPLC-Q-TOF-MS[J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(7): 1382
- [17] 徐海涛. 维生素 A 对感染病毒雄鼠繁殖性能和免疫功能的保护效应[D]. 成都: 四川农业大学, 2008
- XU HT. Protective Effect of Vitamin A on Reproductive Performance and Immune Function of Infected Male Mice[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2008
- [18] 孙红暖, 杨海明, 王志跃, 等. 精氨酸对动物的营养生理及免疫作用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(1): 54
- SUN HN, YANG HM, WANG ZY, *et al.* Nutrition physiological and immune functions of arginine in animals[J]. *Chin J Anim Nutr*, 2014, 26(1): 54
- [19] 杜丽娜, 单进军, 谢彤, 等. 基于液相质谱联用的黄芩水提液抗病毒效应的脂质组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1728
- DU LN, SHAN JJ, XIE T, *et al.* Lipidomics study on antiviral effects of baical skullcap root extraction based on liquid chromatography-mass spectrography[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(5): 1728
- [20] 杜丽娜. 基于 UPLC-MS 技术的呼吸道合胞病毒肺炎痰热闭肺证代谢模式及金欣口服液干预研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015
- DU LN. Metabolic Pattern of Respiratory Syncytial Virus Pneumonia and Heat-closed Lung Syndrome Based on UPLC-MS Technique and Intervention of Jinxin Oral Liquid[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2015
- [21] 谢彤, 杜丽娜, 徐建亚, 等. 基于脂质代谢网络的虎杖抗呼吸道合胞病毒肺炎代谢组学研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(9): 1670
- XIE T, DU LN, XU JY, *et al.* Metabonomics study on the effect of *Polygonum cuspidatum* on anti-respiratory syncytial virus (RSV) basing on lipid metabolism[J]. *World Chin Med*, 2016, 11(9): 1670

(本文于 2018 年 2 月 23 日收到)