

代谢组学技术及其在针灸关键科学研究中的应用

邓淑芳 吴巧凤 杨明晓 陈 亮 陈 琳 赖祯宏 庄 艺 于 正 梁繁荣

(成都中医药大学针灸推拿学院, 成都, 610075)

摘要 随着针灸现代化、国际化的发展,用现代科技手段阐明针灸经典理论的科学内涵成为世界传统医药研究的重点,代谢组学是系统生物学的重要组成部分并被广泛应用于多个领域,针灸与代谢组学技术的有机结合成为必然。通过对代谢组学的研究方法、分析策略与技术及在针灸关键科学研究中的应用现状等进行分析与论述,提出将代谢组学技术引入针灸学研究,对于发展针灸理论、提高针灸临床疗效,促进针灸学的现代化和国际化发展有着十分重要的科学意义和临床实用价值。

关键词 代谢组学;针灸;作用机制;针灸现代化

Applying Metabolomics Technology in Solving Scientific Problems of Acu-moxibustion

Deng Shufang, Wu Qiaofeng, Yang Mingxiao, Chen Liang, Chen Lin, Lai Zhenhong, Zhuang Yi, Yu Zheng, Liang Fanrong
(Acupuncture and Moxibustion College, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

Abstract With the modernization and globalization of acupuncture and moxibustion, scientifically explaining the classical theory of acupuncture and moxibustion becomes one of the focus of the traditional medicine researches. Metabonomics is an important method of systematic biology and has been widely applied in many fields. Recently, it is an inevitable trend to combine acupuncture and moxibustion and metabonomics to investigating the mechanism of acupuncture. In this review, we summarized the advanced detecting methods of metabonomics, the analysis strategies and software of metabonomics and its current application status in the key scientific problems of acupuncture and moxibustion. In conclusion, we believe that metabonomic method will bring new directions for acupuncture research as well as clinic practice, in supportive of its modernization and globalization.

Key Words Metabonomics; Acupuncture; Mechanism; Modernization of Acupuncture

中图分类号:R245-3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.04.002

代谢组学(Metabonomics/Metabolomics)是对某一生物、细胞在某一特定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析的一门科学,是继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后系统生物学的另一重要分支与研究领域,该研究具有整体性和动态性的特点。随着代谢组学在医疗、卫生领域的广泛应用,针灸与代谢组学技术的有机结合成为新的研究方向。大量研究表明,机体接受针灸刺激所产生的作用是多途径、多环节、多层次、多靶点的整体性调节作用,与代谢组学技术的优势特点有很大一致性,符合针灸研究需要,代谢组学借助现代分析技术、化学计量学和生物信息学技术,从全局的角度揭示针灸的调节机制。因此,采用代谢组学技术研究针灸的基础理论和作用机理,有望为针灸的治疗效应提供更符合机体实际情况的证据,为针灸的基础研究提供指引和参考,揭示针灸现代科学内涵。

1 代谢组学研究的生物样品及影响因素

代谢组学研究常用的生物样本是生物体的各种

体液,如血浆或血清、尿液、脑脊液、唾液等,以及生物组织样品^[1],粪便提取物^[2],细胞提取液,细胞培养液等。

生物样品的采集是代谢组学研究的初始步骤,生物样本自身的质量往往决定了代谢组学研究的可靠性和价值。在实验设计时,要充分考虑到代谢组学的影响因素,影响生物样本质量的主要因素包括样本种类、采集时间、采集部位、样本数、前处理方式等。如在研究人类样本时,需考虑组间的性别、年龄、饮食、环境、运动^[3]等;在选取实验动物时应选取品种、性别相同、周龄、体重相近的动物^[4-5]。

2 生物样品的预处理

样品的预处理是整个代谢组学研究中的重要内容,应该根据不同的化合物选择不同的提取方法,并对提取条件进行优化,除去干扰杂质,将样品转化为适合测定的物质形式,以提高仪器检测时的灵敏度和选择性^[6]。基于代谢组学分析的系统性,整个提取和预处理样品的操作过程应尽可能保留和体现样

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(编号:2012CB518500);国家自然科学基金项目(编号:81373737)

作者简介:邓淑芳(1988—),女,硕士研究生在读,研究方向:经穴效应循经特异性规律及关键影响因素基础研究, E-mail:405144142@qq.com

通信作者:梁繁荣(1956—),男,教授,博士生导师,研究方向:经穴效应特异性规律的临床与基础研究, E-mail:acuresearch@126.com

品中代谢物组分的完整信息^[7]。

3 代谢组学的分析技术

目前,代谢组学主要的分析技术如核磁共振(NMR)、色谱、MS 等在代谢组学研究中得到了广泛的应用^[8]。表 1 列出了代谢组学分析技术部分典型研究案例。

表 1 代谢组学分析技术的部分典型研究案例

代谢组学技术	研究对象	生物样本	研究结果	参考文献
¹ HNMR	人	血清	脂质、乳酸盐等含量升高 葡萄糖、牛磺酸等含量降低	[10]
GC-MS	人	血浆	甘油酸等峰值上升;苯丙氨酸等峰值降低	[12]
GC-MS	大鼠	血浆	发现 β-羟基丁酸、酪氨酸、肌酐等生物标志物	[15]
LC-MS/MS	大鼠	胆汁	0.5~1 h 给药后胆汁中的药物排泄量最高	[18]
LC-MS/MS	人	乳腺组织	在乳腺组织中检测出主要甾体激素,即雄性激素、糖皮质激素、孕激素、雌激素等	[21]

3.1 NMR 技术 NMR 是代谢组学应用研究普遍的方法。NMR 方法有如下优点:1)无损伤性,既不会破坏样品的结构和性质,也无辐射损伤;2)能够在接近生理条件下进行实验,可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件;3)可对样品进行实时和动态的检测;4)可设计多种编辑手段,实验方法灵活多样;5)样品处理简单,尿液和血清是经常使用的样品;6)NMR 谱中信号强度与样品浓度成正比,可以对代谢物进行定量分析^[9],对所有化合物的灵敏度是一样的。因此,NMR 技术适合代谢产物中复杂混合成分的研究。

同时,NMR 技术也有一定的缺点:1)与质谱相比,其灵敏度低,对高通量差异较大的样品同时检测难度大,因此,在采集样品时往往需要使用 500MHz、600MHz 甚至更高场强的 NMR 仪;2)核磁谱中内源性物质多,代谢物谱峰重叠严重,影响对代谢物的定性及定量分析;3)测量的动态范围窄;4)仪器的成本高。

刘等^[10]通过核磁共振¹H 谱(¹HNMR)技术检测乳腺纤维瘤患者及乳腺浸润性导管癌患者的血清代谢组特征,分别采用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别法(OPLS-DA)分析二者之间的代谢差异,结果显示与乳腺纤维腺瘤患者相比,浸润性导管癌患者血清中脂质、乳酸盐、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱的含量升高,而谷氨酰胺、牛磺酸、肌酸和葡萄糖含量降低,两种疾病在血清代谢组上具有明显

的代谢差异,这些具有明显变化的代谢物可作为潜在血清代谢标记物,为临床区分良恶性肿瘤提供了参考。

3.2 色谱-质谱联用技术 与 NMR 相比,色谱-质谱联用技术具有灵敏度高、分离效率高、分析时间短、处理样品简便等特点,可以对样品进行高通量分析。

3.2.1 GC-MS 技术 GC-MS 是测量小分子代谢物的首选方法,尤其是初级代谢产物,如有机酸、氨基酸等,具有高精密度、灵敏度及耐用性^[11],与 LC-MS 相比,主要的优势在于有标准质谱图库辅助代谢物鉴定,易对代谢物进行定性。

GC-MS 不足之处在于只能对挥发性和热稳定性好的组分进行分析,由于大多数代谢产物是不能挥发的,不能直接进样分析,因此,对于难挥发或热不稳定的样品要进行衍生化处理,转化成相应的挥发性衍生物以满足 GC/MS 检测。如 Zeng 等^[12]采用 GC-MS 检测正常体重、超重和肥胖儿童的血浆样本,通过分析代谢指纹图谱发现这 3 组样本的代谢模式是不同的,经过进一步的非相关线性判别分析和典型相关分析发现了与肥胖相关的潜在生物标志物。但在衍生化过程中,也极易出现分析结果的多变性,并使样品的色谱图复杂化,其中以重峰、多底物现象最为常见,这些现象影响后续数据处理,曲解生物标记物和代谢通路,从而影响代谢组学结果生物意义的阐释。Wang 等^[13]提出采用独立成分分析方法,分解相互独立的信号分量,有助于多种代谢物的鉴定。全二维气相色谱-飞行时间质谱(GC×GC-TOF/MS)适合于复杂样品的分离分析。Hantao 等^[14]运用 GC×GC-TOF/MS 对先天性新陈代谢异常患者尿液中的有机酸进行了分析,结果发现某些特定的有机酸(如巴豆酰甘氨酸等)可以作为这种疾病诊断的标志物,并且证明了 GC×GC-TOF/MS 用来定量分析的有效性。Zhang 等^[15]采用 GC-MS 结合多元统计分析对饮食诱导的高脂血症大鼠代谢物进行分析,结果发现了潜在的生物标记物有:β-羟基丁酸、酪氨酸和肌酸酐。这说明利用代谢组学去识别病理生理状态有可能建立一个新的早期诊断人类疾病的方法学。

GC-MS 技术被广泛运用,许多计算机工具也随之应运而生,其中,自动质谱图解卷积系统(The Automated Mass Spectral Deconvolution System, AMDIS)是最常用的代谢物定性定量软件。然而,AMDIS 易出现假阳性,并且没有一个接口适合于高通量数据

分析, 尽管其他的计算机工具可以处理 AMDIS 的结果使其正常化, 并可进行代谢组学数据的统计分析, 但 GC-MS 还没有独立的免费软件可以定性和定量代谢物。Aggio 等^[16]将 MetaBox 与 AMDIS 软件进行对比, 评估其实用性和潜力, 结果发现, MetaBox 相对于 AMDIS 出现了较低的假阳性率和假阴性率, 并能够报告出更高一些的与雌雄小鼠代谢相关的潜在生物标志物。

3.2.2 LC-MS 技术 LC-MS 适用样品范围较广, 现在大多数药物和外源性代谢产物的研究都用此技术。与 GC-MS 相比, LC-MS 具有分离效能高、分析速度快、检测灵敏度高的特点, 同时不受样品挥发性和热稳定性的限制, 无需衍生化处理。LC-MS 虽然缺少标准谱图数据库, 但可以通过它获得代谢物精确的分子质量数, 在通过数据库进行检测确定分子的结构信息^[17]。LC-MS 主要的缺点是共流出峰间的离子抑制/诱导作用、基质效应等问题。

于等^[18]建立了大鼠胆汁中氧化白藜芦醇的液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法, 测定了灌胃给药氧化白藜芦醇 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后不同时间段内大鼠胆汁中的含量, $0.5 \sim 1 \text{ h}$ 给药后胆汁中的药物排泄量最高, 随时间推移排泄量逐渐下降, 12 h 内药物总排泄量约为总给药量的 0.737% , 实验结果表明 LC-MS/MS 分析方法耗时短 (每个样品仅用 3 min), 专属性强, 且准确度和精确度均可满足体内药物分析的要求。Kelly 等^[19-20]发展了一种基于酰胺柱或氨基柱 HILIC 分离结合正、负离子模式切换 MRM 检测的靶向代谢组学方法, 分析了血、尿、细胞及组织等样本里的 258 种代谢物。此方法一次性可检测的代谢物数目还可再扩增, 可达 350 个左右。Gaikwad 等^[21]结合液液萃取建立了乳腺组织中甾体化合物的 LC-MS/MS 分析方法, 该法可在 12 min 内检测女性乳腺组织中的 100 种甾体激素及其结合物, 结合不同机制的色谱分离模式, 可以扩大靶向代谢组学的检测覆盖面, 达到接近于非靶向代谢组学全谱检测的效果。

可见, 代谢组学技术在医学领域的广泛应用, 不仅可用于辅助疾病的诊断, 而且还可以评估疾病的临床病程等, 通过对代谢谱的了解, 还可以揭示疾病的生理病理机制。尽管代谢组学技术仍存在自身缺点, 但随着社会的进步和研究的深入, 相信代谢组学也将迎来更为广阔的前景。

4 代谢组学在针灸关键科学问题研究中的应用

4.1 代谢组学在针灸效应机制中研究 针灸作为

一种补充替代疗法, 越来越受到人们的青睐, 但其分子机制和生物途径仍不清楚, 现代科学研究的证据不足, 在一定程度上阻碍了针灸现代化的进程。代谢组学是从寻找单一生物标志物转向寻找特异性的一组代谢标志物群, 进而反映检测样本中所有代谢物的信息, 并且与当代快速发展的代谢网络研究相结合, 契合了针灸多指标、多层次、多靶点的研究需要, 可对阐释针灸效应规律和生物学基础提供有价值的信息。

韩等^[22]基于四级杆-飞行时间质谱 (Q-TOF) 代谢组学方法, 探讨了脾虚型肠易激综合征 (IBS) 患者隔药灸脐法治疗前后尿样的代谢产物谱特征, 研究结果发现患者的代谢谱发生了显著性变化, 其中变化较为显著的是氨基酸、胆汁酸、儿茶酚胺类及内源性大麻素代谢物, 这些代谢物涉及到体内的氨基酸代谢、神经递质代谢及内源性大麻素代谢等过程。Yan 等^[23]针刺足三里, 显著改变的五个代谢通路是: α -亚麻酸代谢, 谷氨酸盐和谷氨酸酯代谢, 柠檬酸循环、丙氨酸和谷氨酸盐代谢, 以及维生素 B₆ 代谢途径明显被扰动, 还有 53 种不同的代谢产物被认为与阐明足三里的生理基础和机制相关, 并提出尿液代谢谱是研究针灸分子机制的一种很有前途的方法。Zhang 等^[24]使用代谢组学的方法检测发现卵巢切除术引起大鼠体内脂质过氧化, 糖酵解, 三羧酸循环, 胆固醇和氨基酸代谢异常, 而不管是使用穴位激光照射还是穴位埋线的方法都可以改善紊乱的代谢, 且效果优于激素治疗。Wu 等^[25]通过基于 NMR 的代谢组学方法研究针刺的生物学效应, 研究发现针刺功能性消化不良患者可显著改变亮氨酸/异亮氨酸、乳酸、葡萄糖的含量。Wu 等^[26]进一步研究发现老化促进小鼠血浆内的乳酸盐明显减少, 其他的改变包括二甲胺胆碱、葡萄糖升高, 亮氨酸/异亮氨酸、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白/及低密度脂蛋白、3-羟基丁酸和氧化三甲胺减少。电针治疗后, 乳酸盐、二甲胺胆碱和氧化三甲胺的含量上升。更有学者通过研究发现, 针灸可以恢复代谢网络。Wen 等^[27]采用基于超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS) 代谢组学技术分析急性痛风性关节炎大鼠的尿液和血浆, 探讨针刺治疗急性痛风性关节炎的生物学效应和潜在的机制, 结果发现针刺可以恢复代谢网络, 并认为利用 UPLC-MS 代谢组学技术将为研究针刺治疗急性痛风性关节炎的生物效应提供一个独特视角。杨等^[28]运用 $^1\text{H-NMR}$ 技术研究足阳明经穴位电针疗法对溃疡性结肠炎大鼠大脑皮层代谢物的影

响,结果发现,电针干预后溃疡性结肠炎大鼠模型脑皮质中乳酸、谷氨酸、TC 和 VLDL 均升高,而丙氨酸和 LDL 含量降低。这一结果表明,针刺治疗溃疡性结肠炎有其特定的代谢组学物质基础和机制。

以上证据表明利用代谢组学技术可以进一步去理解疾病的发病机理以及针刺效应的发挥,针灸的作用机制可能是对患者体内紊乱的代谢途径进行良性调节,恢复了代谢网络,针灸治疗后引起的各类代谢物变化的作用可能与针灸提高大脑的能量代谢、蛋白合成及各种化学反应有关。

4.2 应用代谢组学进行经穴效应特异性研究 经穴效应特异性作为针灸经典理论的核心和提高针灸疗效的关键,已成为国际针灸研究最重要的热点领域。因此,深入研究和阐明经穴效应特异性基本规律及其科学内涵,符合我国卫生事业和社会发展的重大需要。吴等^[29]采用基于核磁共振(¹HMR)和模式识别技术的代谢组学方法分别观察针刺阳明经穴与他经穴位对健康男性尿液代谢产物的影响,从针刺对机体代谢流影响的角度探讨阳明经穴的特异性,结果发现针刺阳明经穴对机体尿液代谢物的影响基本一致,均可以升高尿液中马尿酸和氧化三甲胺的含量,降低甘氨酸含量,针刺阳明经穴与针刺阳陵泉对尿液代谢物的影响差别不大,但与针刺委中后的差异明显,从针刺对机体代谢谱影响的角度探讨了阳明经穴的特异性。吴等^[30]另一个研究发现针刺足三里、天枢、上巨虚对溃疡性结肠炎大鼠脑皮层代谢物有明显影响,特别是对是水溶性代谢物的影响更明显,对脂溶性代谢产物影响较小,其中,乳酸、磷酸肌酸、N-乙酰天冬氨酸、低密度脂蛋白等代谢物是针刺经穴作用的关键代谢物;而针刺非经非穴对溃疡性结肠炎大鼠脑皮层代谢物的影响主要表现在 γ -氨基丁酸、缬氨酸等,这些数据表明针刺非经非穴的脑代谢与经穴组存在着差异,提示采用经穴针刺治疗溃疡性结肠炎具有一定的脑特异性代谢物质基础。

5 讨论

目前,代谢组学研究日渐成熟,其关注的是各种代谢路径底物和产物的小分子代谢物,反映细胞或组织在外界刺激或是遗传修饰下代谢应答的变化,可整体性反映机体的功能状态,与针灸的整体性调节特点具有异曲同工之处。因此,我们认为,将代谢组学技术引入针灸学研究,一则可以识别疾病潜在的生物标志物,对病理生理过程有一个更深入的了解,二则可为针灸基础研究提供更科学、更符合针灸

作用规律的证据,并全面、系统地揭示针灸学的科学内涵,促进针灸现代化。因此,代谢组学技术不仅可能成为中西医沟通的纽带,同时将是揭示中医理论科学内涵的有效工具。

随着对代谢组学的深入研究,各种影响代谢组学研究的细节因素和技术瓶颈也逐步被揭示,怎样保证代谢组学研究结果的可靠性、重现性、科学性是我们现在所面临的“瓶颈问题”。目前,用于代谢组学数据处理的商品化软件应运而生。例如 Metabo-Analyst、MZmine、XCMS 等可处理 GC/MS 和 LC/MS 数据,MestreNova、XwinNMR、MesReC 等可处理 NMR 数据。但研究发现,虽然这些软件可以被用来处理数据,但其科学性值得探究。Koh 等^[31]基于 GC/MS 代谢组学技术,通过 Calibration feature、Statistical Compare、MetAlign、MZmine 这几种软件对数据进行预处理,比较不同软件的峰对齐准确度,结果发现不同软件准确度都不能达到 100%,且存在差异,对实际生物样本数据处理后所构建的 OPLS-DA 模型的预测能力也存在差异。因此,在实际工作中,我们需慎重选择合适的软件处理数据,并在软件处理的基础上,更应仔细核对信息,以确保代谢组学数据真实可靠。

此外,代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,其研究领域、研究思路及研究技术都有待开拓和创新,如将细胞、动物研究所获得的研究结论充分的转化到人体样本研究中;将代谢组学的数据与其他组学(如蛋白组学、基因组学、转录组学等)多组学数据融合,并与临床相关数据结合,以此发现包含了不同数据内容的复合生物标志物;开发更有效的代谢组学数据分析技术等等。因此,我们相信,将代谢组学技术与针灸研究有机结合,在针灸基础与临床研究的思路与方法上有所创新,随着技术的进步和成熟,针灸与以代谢组学为核心的系统生物学结合,将会对针灸的现代化研究带来新的突破。

参考文献

- [1] Nicholson J K, Connolly J, Lindon J C, et al. Metabonomics; a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. Nature reviews Drug discovery, 2002, 1(2): 153-161.
- [2] Marchesi J R, Holmes E, Khan F, et al. Rapid and noninvasive metabolomic characterization of inflammatory bowel disease[J]. Journal of proteome research, 2007, 6(2): 546-551.
- [3] 周思远, 吴巧凤, 李瑛, 等. 代谢组学技术在针刺研究设计中的质量控制[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 836-838.
- [4] 罗和古, 丁杰, 岳广欣, 等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3): 307-313.

- [5] 徐斌, 赵毅民. 大鼠口服龙胆水煎剂后尿液代谢谱的变化[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(3): 221–6.
- [6] Álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, Castro M. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29(2): 120–127.
- [7] Schripsema J. Application of NMR in plant metabolomics; techniques, problems and prospects [J]. Phytochemical Analysis, 2010, 21(1): 14–21.
- [8] Zhang A, Sun H, Wang P, et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis [J]. Analyst, 2012, 137(2): 293–300.
- [9] Griffiths L. Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits [J]. Analyst, 1998, 123(5): 1061–1068.
- [10] 刘影, 冀天星, 李江超, 等. 基于核磁共振 ^1H 谱的乳腺纤维腺瘤与乳腺浸润性导管癌血清代谢组学的比较 [J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(8): 879–883.
- [11] Qiu Y, Su M, Liu Y, et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography – mass spectrometry based metabolomic profiling [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 583(2): 277–283.
- [12] Zeng M, Liang Y, Li H, et al. Plasma metabolic fingerprinting of childhood obesity by GC/MS in conjunction with multivariate statistical analysis [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, 52(2): 265–272.
- [13] Wang G, Cai W, Shao X. A primary study on resolution of overlapping GC-MS signal using mean-field approach independent component analysis [J]. Chemometrics and intelligent laboratory systems, 2006, 82(1): 137–144.
- [14] Hantao L W, Aleme H G, Passador M M, et al. Determination of disease biomarkers in eucalyptus by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1279: 86–91.
- [15] Zhang Q, Wang G, Ma B, et al. Metabonomic profiling of diet-induced hyperlipidaemia in a rat model [J]. Biomarkers, 2010, 15(3): 205–216.
- [16] Aggio R B, Mayor A, Reade S, et al. Identifying and quantifying metabolites by scoring peaks of GC-MS data [J]. BMC bioinformatics, 2014, 15(1): 374.
- [17] Gika H G, Theodoridis G A, Plumb R S, et al. Current practice of liquid chromatography – mass spectrometry in metabolomics and metabolomics [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014, 87: 12–25.
- [18] 于斌, 梁芳, 黄光玉, 等. LC-MS-MS 研究氧化白藜芦醇在大鼠胆汁中的代谢 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 116–119.
- [19] Kelly A D, Breitkopf S B, Yuan M, et al. Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma [J]. PloS one, 2011, 6(10): e25357.
- [20] Yuan M, Breitkopf S B, Yang X, et al. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue [J]. Nature protocols, 2012, 7(5): 872–881.
- [21] Gaikwad N W. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for profiling of steroid metabolome in human tissue [J]. Analytical chemistry, 2013, 85(10): 4951–4960.
- [22] 韩媛媛, 马玉侠, 王晓翠. 隔药灸脐法治疗脾虚型肠易激综合征的尿液代谢组学机制 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 541–544.
- [23] Yan G, Zhang A, Sun H, et al. Dissection of biological property of Chinese acupuncture point zusanli based on long-term treatment via modulating multiple metabolic pathways [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 429703.
- [24] Zhang L, Wang Y, Xu Y, et al. Metabonomic Analysis Reveals Efficient Ameliorating Effects of Acupoint Stimulations on the Menopause-caused Alterations in Mammalian Metabolism [J]. Scientific reports, 2014, 4: 3641.
- [25] Wu Q, Zhang Q, Sun B, et al. ^1H NMR-based metabonomic study on the metabolic changes in the plasma of patients with functional dyspepsia and the effect of acupuncture [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, 51(3): 698–704.
- [26] Qiao-Feng W, Ling-Ling G, Shu-Guang Y, et al. A ^1H NMR-based metabonomic study on the SAMP8 and SAMR1 mice and the effect of electro-acupuncture [J]. Experimental gerontology, 2011, 46(10): 787–793.
- [27] Wen S L, Liu Y J, Yin H L, et al. Effect of acupuncture on rats with acute gouty arthritis inflammation; a metabonomic method for profiling of both urine and plasma metabolic perturbation [J]. The American journal of Chinese medicine, 2011, 39(2): 287–300.
- [28] 杨阳, 赵纪岚, 侯天舒, 等. 基于脾胃—脑相关理论研究电针对溃疡性结肠炎大鼠大脑皮层代谢物的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(10): 1207–1211.
- [29] 吴巧凤, 徐世珍, 余曙光, 等. 基于 ^1H NMR 代谢组学的阳明经穴特异性研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2674–2676.
- [30] 吴巧凤, 杨阳, 赵纪岚, 等. 基于 ^1H NMR 代谢组学技术研究针刺经穴与非经穴治疗溃疡性结肠炎的脑代谢物质基础 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(8): 572–576.
- [31] Koh Y, Pasikanti K K, Yap C W, et al. Comparative evaluation of software for retention time alignment of gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabonomic data [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(52): 8308–8316.

(2015-03-02 收稿 责任编辑: 洪志强)