

· 组学研究 ·

基于尿液代谢组学的交泰丸治疗失眠的作用研究

龚梦鹃^{1,2,3}, 岳 贺^{1,2,3}, 周祥羽^{1,2,3}, 王淑美^{1,2,3}, 梁生旺^{1,2,3}, 邹忠杰^{1,2,3} (1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东 广州 510006; 3. 广东高校中药质量工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 从代谢网路层面阐明交泰丸干预对氯苯丙氨酸(p-chlorophenylalanine, PCPA)致大鼠失眠的药效及作用机制。**方法** 采用一次性腹腔注射 PCPA 建立失眠大鼠模型; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中的谷氨酸(Glu)、胆囊收缩素 8(CCK-8)水平; 采用核磁共振氢谱(¹H-NMR)技术结合多变量数据分析方法研究失眠所致大鼠尿液代谢物谱的变化并鉴定相关代谢标志物, 从整体代谢表型和代谢标志物角度评价交泰丸疗效。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠的下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中的 Glu 水平显著升高($P < 0.05$), CCK-8 水平显著降低($P < 0.05$), 尿液代谢物组发生显著改变($P < 0.05$); 与模型组比较, 交泰丸能明显降低大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu 水平, 升高 CCK-8 水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 交泰丸能对失眠大鼠尿液代谢紊乱产生有效干预, 对尿液中与失眠相关的 9 个潜在生物标志物中的 8 个产生显著回调, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 交泰丸可能通过调节神经递质及干预机体能量代谢和肠道菌群代谢紊乱对失眠起到治疗作用。

关键词: 交泰丸; 失眠; 代谢组学; 核磁共振; 对氯苯丙氨酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.

Investigation on the therapeutic effect of Jiaotai Pill on insomnia using a urinary metabonomic approach

Gong Mengjuan^{1, 2, 3}, Yue He^{1, 2, 3}, Zhou Xiangyu^{1, 2, 3}, Wang Shumei^{1, 2, 3}, Liang Shengwang^{1, 2, 3}, Zou Zhongjie^{1, 2, 3} (1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica of State Administration of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Engineering ? and Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of the Universities of Guangdong Province, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the intervention effects of Jiaotai Pill on p-chlorophenylalanine (PCPA) -induced insomnia in rats and the underlying mechanism from the point of view of metabonomics. **Methods** The insomnia model was established by intraperitoneal injection of PCPA to rats once. The levels of glutamate (Glu) and cholecystokinin 8 (CCK-8) in hypothalamus, hippocampus, prefrontal cortex and serum of rats were determined by using ELISA. Moreover, a proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) based metabonomic approach in combination with multivariate data analysis was applied to demonstrate insomnia-induced metabolic perturbations in rat urine and identify the corresponding metabolic biomarkers. The intervention effect of Jiaotai Pill on insomnia was evaluated based on the changes of metabolic phenotype and potential biomarkers related to insomnia. **Results** Compared with the healthy control group, rats with insomnia showed increased level of Glu and decreased level of CCK-8 in hypothalamus,

收稿日期: 2017-02-23

作者简介: 龚梦鹃, 女, 副教授, 研究方向: 中药药理学。Email: gongmengjuan@139.com。通信作者: 邹忠杰, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础及代谢组学。Email: zouzhongjie@139.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81603397, 81403075)。

hippocampal, prefrontal cortex and serum together with metabolic perturbations in urine ($P<0.05$)。The disturbed metabolic state associated with insomnia in rat urine could be restored by Jiaotai Pill. Meanwhile, eight potential biomarkers related to insomnia in rat urine were reversed by administration of Jiaotai Pill. ($P<0.05$)。Conclusion The current study showed that Jiaotai Pill exerted protective effects against PCPA-induced insomnia in rats, which was probably mediated by regulation of neurotransmitters and amelioration of disturbance in energy metabolism and gut microbiota.

Keywords: Jiaotai Pill; Insomnia; Metabonomics; NMR; PCPA

失眠属于中医学“不寐”的范畴,相比西药,中医药治疗失眠症具有无成瘾性、无依赖性、不良反应少及无反跳的优点。交泰丸出自明代韩懋的《韩氏医通》一书,全方由黄连、肉桂2味药组成,临床常用于治疗各种类型的失眠,尤其对心肾不交型失眠具有显著疗效^[1]。交泰丸可明显缩短阈上剂量戊巴比妥钠小鼠入睡潜伏期,延长其睡眠时间,增加阈下剂量戊巴比妥钠小鼠的入睡数量,并抑制小鼠自发活动^[2]。其治疗失眠的作用可能与调节 γ -氨基丁酸A(GABAA)受体及下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)的分泌活动有关^[3-5]。

代谢组学从代谢网络的终端症状反映机体整体状况,目前已广泛应用于中药药效研究^[6]。我们前期研究^[7]报道了交泰丸可以有效逆转失眠所致大鼠血清和海马组织代谢物谱的改变。本文采用¹H-NMR代谢组学技术研究对氯苯丙氨酸(p-chlorophenylalanine, PCPA)致失眠大鼠尿液代谢轮廓变化及交泰丸对相关代谢通路和潜在生物标志物的干预作用。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,体质量180~200 g,购自广州中医药大学实验动物中心,SPF级,动物许可证号:SCXK(粤)2013-0034。

1.2 药品及试剂 黄连、肉桂饮片购自广州采芝林大药房,经广东药科大学中药学院韩彬教授鉴定为正品。磷酸盐缓冲液(PBS)和氘水(D₂O,批号:1001484275)均购自美国Sigma公司;PCPA甲酯盐酸盐购自嘉兴思诚化工有限公司,批号:MAYA-CR-912,纯度>98%;蛋白含量测定、谷氨酸(Glu)和胆囊收缩素8(CCK-8)ELISA试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;蛋白酶抑制剂Cocktail购自美国Biotool公司,批号:NJ177437。

1.3 仪器 Bruker AVANCE III 500 MHz全数字化超导核磁共振谱仪,瑞士Bruker公司;ELX-808型酶

标仪,美国BioTek公司;UV-2401-PC型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司。

2 方法

2.1 交泰丸水提液的制备 精确称取适量黄连、肉桂药材,按黄连:肉桂=10:1的比例混合,加10倍量水,浸泡1 h,煎煮2次,每次1 h,合并2次滤液,水浴浓缩至0.5 g·mL⁻¹(按生药量计算)。

2.2 模型复制及给药 参考前期研究^[7]及文献方法^[8,9]复制失眠模型,将36只雄性SD大鼠置于12 h光照和12 h黑暗环境(温度22℃,相对湿度50%)下自由饮食。适应3d后随机分正常组、模型组和交泰丸组。交泰丸组灌胃交泰丸水提液(5 g·kg⁻¹)^[2],每天1次,连续5 d,对照组和模型组灌胃等体积生理盐水。实验第3天,模型组和交泰丸组一次性腹腔注射PCPA甲酯盐酸盐(564 mg·kg⁻¹,相当于PCPA 450 mg·kg⁻¹)建立失眠模型,正常组一次性腹腔注射等体积生理盐水。末次给药3 h后,每组随机取一半动物用于测量下丘脑、海马、前额叶皮质和血清Glu和CCK-8水平,另一半动物用于尿液代谢组学分析。

2.3 大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清采集、处理及Glu和CCK-8水平检测 参照前期研究^[7],大鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,收集的血液样品经凝固(4℃,60 min)后离心(3 500 r·min⁻¹,15 min,4℃)得到血清。冰上分离出大鼠下丘脑、海马和前额叶皮质,用冰冷的生理盐水冲洗,滤纸拭干称质量。各部分脑组织加入9倍量PBS(含1%蛋白酶抑制剂Cocktail)冰水浴中匀浆,离心(3 500 r·min⁻¹,15 min,4℃)得到上清液。血清和组织上清液按试剂盒说明书操作进行Glu和CCK-8指标检测,并采用考马斯亮蓝法(Bradford法)测定组织样品蛋白含量。

2.4 大鼠尿液采集、处理及¹H-NMR测定 大鼠放入代谢笼中收集24 h尿液。尿液收集时,代谢笼集尿器置于冰上,加入0.5 mL 2% NaN₃溶液做防腐

剂。400 μL 尿液中加入 200 μL 磷酸缓冲液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 - $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , pH7.4), 静置 20 min 后离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$), 取上清液 500 μL 加至 5 mm NMR 测试管中, 再加入 50 μL D_2O (含有 0.05 % TSP- d_4 , m/V), 振荡混匀, 待测^[6]。

^1H -NMR 测试时, 实验温度 298 K; 采用有预饱和的 1D NOESY 脉冲序列压制水峰; 弛豫延迟时间 3 s; 采集时间 3.28 s; 谱宽 10 kHz; 采样点数 64 K; 采集次数 128 次。

2.5 ^1H -NMR 图谱处理及多变量数据分析 采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅立叶变换。运用软件 MestReNova 6.1(西班牙 Mestrelab Research 公司)对所获谱图进行手动相位和基线校正后, 参照 TSP(δ 0.0)对 ^1H -NMR 谱的化学位移进行定标^[6]。在 δ 0.5 ~ 9.5 区域按 δ 0.01 等间隔分段积分, 然后将所得数据转换成 ASC II 文件输出到 Excel 2010 版软件中进行下一步处理。将区域 δ 4.50 ~ 5.96 设为 0 积分段, 在进行模式识别分析之前对各分段积分值进行归一化处理, 所得数据乘以 10 000 后导入 SIMCA-P 12.0

(Umetrics AB, Umeå/Malmö, Sweden), 经 Pareto 标度化预处理后, 进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

2.6 统计学处理方法 实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 数据处理采用 SPSS 20.0 软件, 组间比较采用单因素方差分析, 两两数据比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 交泰丸对失眠大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu、CCK-8 水平的影响 结果见表 1。与正常组比较, 模型组大鼠的下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中的 Glu 水平显著升高, CCK-8 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 交泰丸能明显降低大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu 水平, 升高 CCK-8 水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明交泰丸可能通过调节神经递质 Glu 和 CCK-8 水平发挥干预失眠的作用。

表 1 交泰丸对失眠大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu、CCK-8 水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Jiaotai Pill on the level of Glu and CCK-8 in hypothalamus, hippocampus, prefrontal cortex and serum of rats with insomnia

组别	下丘脑		海马		前额叶皮质		血清	
	Glu/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	CCK-8/ $(\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1})$	Glu/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	CCK-8/ $(\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1})$	Glu/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	CCK-8/ $(\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1})$	Glu/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	CCK-8/ $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$
正常组	3.49 ± 0.17	20.68 ± 1.22	2.23 ± 0.18	21.28 ± 1.84	2.11 ± 0.15	24.66 ± 2.49	5.86 ± 0.35	65.79 ± 2.47
模型组	$3.97\pm 0.24^\#$	$17.48\pm 1.15^\#$	$2.76\pm 0.18^\#$	$18.36\pm 1.64^\#$	$2.46\pm 0.14^\#$	$19.81\pm 1.55^\#$	$6.58\pm 0.51^\#$	$57.32\pm 2.30^\#$
交泰丸组	$3.16\pm 0.28^*$	$23.28\pm 2.03^*$	$2.33\pm 0.16^*$	$22.19\pm 1.94^*$	$2.07\pm 0.29^*$	$25.17\pm 1.70^*$	$5.64\pm 0.38^*$	$64.59\pm 3.23^*$

注: 与正常组比较, $^\#P < 0.05$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$ 。

3.2 大鼠尿液的 ^1H -NMR 代谢物谱图 大鼠尿液的 ^1H -NMR 谱图如图 1 所示。代谢物谱峰的归属主要依据化学位移值、峰的裂分情况、耦合常数及参考文献^[10]报道。尿液中的代谢物主要是与能量代谢、氨基酸代谢和肠道菌群代谢等有关的氨基酸、有机酸和酮体等物质。

3.3 对失眠大鼠尿液代谢表型的干预作用 采用 OPLS-DA 研究正常组和模型组大鼠的代谢物谱差异。如图 2-A 所示, 正常组和模型组的尿液样本点在 PC1 维可以完全区分开, 说明 PCPA 诱导失眠后大鼠机体生理及物质代谢状况发生了明显的改变。本研究采用 7 倍交叉验证法对 OPLS-DA 模型的可靠性进行验证, 得到了 OPLS-DA 模型的主要参数: $R^2X(\text{cum})=0.85$, $R^2Y(\text{cum})=0.99$, $Q^2(\text{cum})=0.97$ 。从上述参数可以看出本研究建立的模型具有较高的可靠

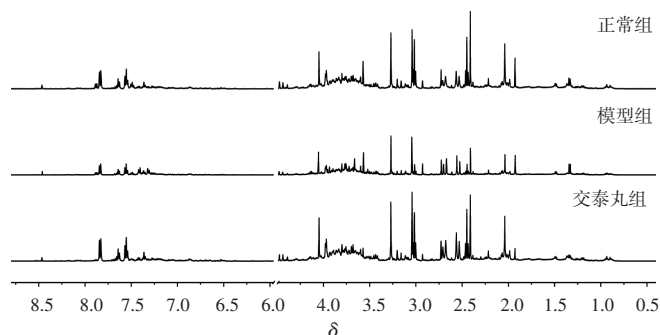


图 1 大鼠尿液 ^1H -NMR 谱图

Figure 1 ^1H -NMR spectra of rat urine

性。图 2-B 表明, 交泰丸组样本点与模型组样本点可以完全分离, 且与对照组样本点接近, 表明交泰丸能对失眠引起的大鼠尿液代谢紊乱进行有效的干预, 并使之逐步恢复到正常状态。

3.4 对失眠大鼠相关潜在生物标志物的影响 本研究

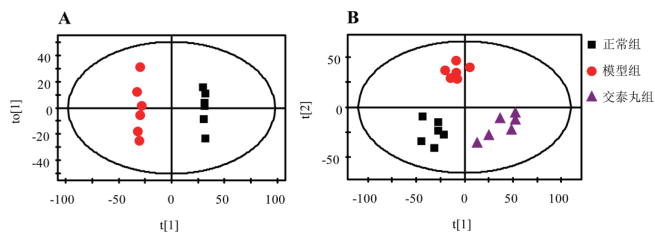


图2 大鼠尿液样本¹H-NMR谱图OPLS-DA散点图
Figure 2 OPLS-DA scatter plots derived from ¹H-NMR spectra of rat urine

使用 OPLS-DA 模型中变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)参数和独立样本 *t* 检验来评价内源性代谢物相对峰面积在正常组和模型组间的差异。只有同时满足 VIP>1 和 P<0.05 的代谢物才被认为是潜在的生物标志物。按照上述原则,最终在大鼠尿液筛选得到 9 种与失眠相关生物标志物。结果见表 2。交泰丸能使与失眠相关的大鼠尿液中的 8 种潜在生物标志物显著性回调,表现为给药组大鼠尿液中二甲基甘氨酸、牛磺酸和苯乙酰甘氨酸水平下调, N-乙酰糖蛋白、丙酮酸、琥珀酸、α-酮戊二酸、二甲胺水平上调,与模型组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。这与图 2 结果相一致,同样表明交泰丸能对失眠大鼠尿液代谢紊乱产生有效的干预作用。

表 2 失眠大鼠尿液相关潜在生物标志物($\bar{x} \pm s$, *n*=6)
Table 2 Potential biomarkers associated with insomnia in rat urine

代谢产物	δ H	VIP	归一化后峰面积		
			正常组	模型组	交泰丸组
N-乙酰糖蛋白	2.04(s)	3.6	142.85 ± 11.79	100.89 ± 16.03 [#]	120.77 ± 12.91 [*]
丙酮	2.22(s)	1.4	36.29 ± 3.51	29.08 ± 3.44 [#]	33.19 ± 3.37
丙酮酸	2.38(s)	1.5	26.66 ± 1.68	19.83 ± 2.87 [#]	23.49 ± 2.73 [*]
琥珀酸	2.41(s)	4.6	150.78 ± 44.76	76.39 ± 21.61 [#]	125.54 ± 17.19 [*]
α-酮戊二酸	2.44(t)	5.6	143.21 ± 24.39	51.54 ± 14.40 [#]	126.38 ± 14.94 [*]
	3.01(t)	5.9	150.10 ± 17.86	50.20 ± 12.73 [#]	124.76 ± 20.66 [*]
二甲胺	2.73(s)	1.2	58.44 ± 3.88	51.69 ± 6.13 [#]	57.88 ± 3.21 [*]
二甲基甘氨酸	2.92(s)	1.8	29.33 ± 6.23	43.36 ± 11.63 [#]	29.27 ± 7.93 [*]
牛磺酸	3.41(t)	1.9	29.60 ± 7.99	44.22 ± 9.68 [#]	28.28 ± 9.80 [*]
苯乙酰甘氨酸	3.76(d)	3.7	84.84 ± 12.42	125.84 ± 7.79 [#]	98.93 ± 21.52 [*]

注:与正常组比较,[#]*P* < 0.05;与模型组比较,^{*}*P* < 0.05。s,单峰,d,双重峰,t,三重峰。

4 讨论

不断加快的生活节奏以及日益增大的竞争压力使得失眠成为不可忽视的健康问题。中医药对失眠证有良好疗效,已有研究^[3,4]显示交泰丸具有镇静催眠的作用,可改善 PCPA 导致的大鼠失眠。PCPA 可

以选择性作用于色氨酸羟化酶,抑制大鼠大脑 5-HT 合成,造成睡眠昼夜节律消失,几乎达到完全失眠。PCPA 诱导的大鼠失眠模型是目前被广泛接受的用来研究失眠机制和药效评价的模型之一^[8,9]。

谷氨酸(Glu)对中枢神经系统神经元起兴奋作用,是主要的兴奋性递质,其释放的增加导致细胞内 Ca²⁺超载引发神经细胞凋亡坏死,具有兴奋性神经毒性,在失眠中起重要作用^[11]。胆囊收缩素(CCK)是近年研究渐多的调节睡眠的物质之一。Crosby^[12]等研究发现神经元去极化释放 CCK,其作为自分泌信号增强 NMDA 受体活性,刺激 NO 释放,随后的逆行 NO 信号刺激突触前末梢释放 γ-氨基丁酸(GABA),CCK 通过影响脑内 GABA 来调节睡眠。CCK-8 具有胆囊收缩素全部生物活性,主要分布大脑皮质、海马、杏仁核和下丘脑,其中以大脑皮质分布最丰富^[13],是脑中含量最高的神经肽。本研究表明,与正常组相比,失眠模型组大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu 水平显著升高,CCK-8 水平显著降低。交泰丸可显著降低失眠大鼠下丘脑、海马、前额叶皮质和血清中 Glu 水平,显著升高 CCK-8 水平,提示交泰丸可能通过调节神经递质 Glu 和 CCK-8 水平发挥干预失眠的作用。

代谢组学主要利用核磁共振(NMR)、气质联用(GC-MS)和液质联用(LC-MS)等分析技术手段,通过定量测定生物体液中分子的内源性代谢产物,研究生物体如细胞、组织、生物个体等在病理生理或基因修饰等刺激导致的代谢物的变化,通过整体分析代谢物图谱,对机体病理生理状态进行直接认识,并与多变量统计分析方法联合,确定内源性代谢物的变化模式,筛选出相关的潜在生物标志物,整体上探讨机体在特定条件下的病理生理状态^[14]。本实验在结合前人的研究基础上,采用代谢组学方法对交泰丸治疗失眠的作用进行了研究。

酮体是脂肪酸在肝脏中 β-氧化后的中间代谢产物,是肝脏输出能源的一种形式。前文报道^[7]失眠模型大鼠血清中不饱和脂肪酸水平升高,本研究中模型组大鼠尿液丙酮含量降低可能是机体脂质代谢失调的一种表现。丙酮酸是糖酵解过程的产物,其位于无氧分解和有氧分解的交界点上,是极为重要的中间产物。模型组大鼠尿液中丙酮酸水平下降,同时,与三羧酸循环相关的代谢产物含量降低,如尿液中的 α-酮戊二酸和琥珀酸,这表明失眠状态下,机体能量代谢紊乱,糖的有氧代谢活动减弱。

尿液中由肠道菌群或者由肠道菌群和宿主共代谢产生的代谢物如二甲胺、苯乙酰甘氨酸含量的变化可能暗示失眠状态下肠道菌群结构和代谢功能的改变^[10]。由此可见,交泰丸可以改善与失眠相关的能量代谢和肠道菌群代谢紊乱。

本研究利用经典生化指标检测与组学技术相结合的方法评价了交泰丸治疗失眠的疗效,结果表明交泰丸可能通过调节神经递质及干预机体能量代谢和肠道菌群代谢紊乱对失眠起干预作用。本研究结果为交泰丸的临床应用提供了一定的理论基础,同时为治疗失眠的药效评价提供了参考。

参考文献:

- [1] 张坤瑞,刘耀,高军,等. 交泰丸治疗失眠症 149 例临床研究[J]. 实用中医药杂志, 1994, 10(4): 12-13.
- [2] 寇俊萍,吴彦,王清,等. 正生黄连或酒制黄连对交泰丸镇静催眠作用的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 15-17.
- [3] 余运龙,全世建. 交泰丸对 PCPA 失眠大鼠大脑 γ -氨基丁酸及受体的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1417-1418.
- [4] 余运龙,全世建. 交泰丸对 PCPA 大鼠下丘脑 5-HT、NE 的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2803-2804.
- [5] 王红丹,全世建,盛亚男. 交泰丸对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠血清细胞因子的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(6): 525-527.
- [6] GONG M J, HAN B, WANG S M, et al. Icariin reverses corticosterone-induced depression-like behavior, decrease in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR-based metabolomics in rats[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, (123): 63-73.
- [7] 岳贺,周祥羽,李春苑,等. 交泰丸干预对氯苯丙氨酸致大鼠失眠的代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3451-3456.
- [8] BORBÉLY A A, NECHAU H U, TOBLER I. Effect of p-chlorophenylalanine and tryptophan on sleep, EEG and motor activity in the rat[J]. Behav Brain Res, 1981, 2(1): 1-22.
- [9] SATOH S, MATSUMURA H, NAKAJIMA T, et al. Promotion of sleep by prostaglandin D2 in rats made insomniac by pretreatment with para-chlorophenylalanine[J]. Neurosci Res, 1994, 21(1): 41-50.
- [10] WEI L, LIAO P, WU H, et al. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by 1H NMR spectroscopy[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 234(3): 314-325.
- [11] BROSNAN J T, BROSNAN M E. Glutamate: a truly functional amino acid[J]. Amino Acids, 2013, 45(3): 413-418.
- [12] CROSBY K M, BAIMOUKHAMETOVA D V, BAINS J S, et al. Postsynaptic depolarization enhances GABA drive to dorsomedial hypothalamic neurons through somatodendritic cholecystokinin Release [J]. J Neurosci, 2015, 35(38): 13160-13170.
- [13] EMSON P C, REHFELD J F, ROSSOR M N. Distribution of cholecystokinin-like peptides in the human-brain [J]. J Neurochem, 1982, 38(4): 1177-1179.
- [14] 黄晓晨,宿树兰,郭建明,等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考[J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.

(编辑: 邹元平)