

彭晓婷,马琪,张晓松,等. 湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 700–708.

Peng XT, Ma Q, Zhang XS, et al. Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 700–708.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.003

湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究

彭晓婷¹,马琪²,张晓松¹,华永丽^{1*},纪鹏¹,姚万玲¹,魏彦明^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 西南大学动物科学学院, 重庆 402460)

【摘要】 目的 应用基于超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间二级质谱联用(UPLC-Q/TOF-MS/MS)尿液代谢组学方法筛选湿热泄泻潜在代谢标志物,探讨大鼠湿热泄泻发病机制。**方法** 采取高糖高脂(HF)+高温高湿(HH)+腹腔注射产肠毒性大肠杆菌(EC)建立大鼠湿热泄泻模型,采集大鼠造模各阶段(高糖高脂,高温高湿,攻毒)尿液样本,应用尿液代谢组学技术分析样本,多元统计分析方法分析代谢数据。**结果** 筛选出左旋谷酰基-左旋半胱氨酸、左旋甲酰犬尿氨酸、5-羧基-N-甲酰犬尿氨酸、核黄素-5-磷酸、亚油酸、左旋色氨酸和褪黑素等7个潜在代谢标志物。**结论** 湿热泄泻涉及色氨酸代谢、核黄素代谢与亚油酸代谢等代谢通路,表明大鼠体内出现能量、氨基酸及脂类代谢紊乱,本研究结果为揭示中(兽)医湿热泄发病机制提供了参考依据。

【关键词】 湿热泄泻;超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间二级质谱联用;尿液;代谢组学;生物标志物;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0700-09

Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea

PENG Xiaoting¹, MA Qi², ZHANG Xiaosong¹, HUA Yongli^{1*}, JI Peng¹, YAO Wanling¹, WEI Yanming^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China.

2. Institute of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460)

Corresponding author: HUA Yongli. E-mail: huayongli2004@163.com; WEI Yanming. E-mail: weiyym@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective The ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass/mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS/MS) urine metabolomics method was used to screen for potential metabolic markers of rat model of damp-heat diarrhea and to explore the pathogenesis. **Methods** The rat model of damp-heat diarrhea was established using a high-sugar and high-fat diet (HF), a high-temperature and high-humidity environment (HH), and intraperitoneal injection of *Escherichia coli* (EC). Urine samples were collected from rats at different stages of modeling (HF, HH, and EC) and analyzed using UPLC-Q/TOF-MS/MS. The data were analyzed by multivariate statistical analysis. **Results** Seven potential endogenous biomarkers were screened, namely, L-glutamic acid-L-cysteine, L-formyl kynurenine, 5-hydroxy-N-formylkynurenine, riboflavin-5-phosphate, linoleic acid, L-tryptophan and melatonin. **Conclusions** The metabolic pathways involved in damp heat diarrhea include metabolic pathways such as tryptophan metabolism, riboflavin metabolism, and linoleic acid metabolism. The results suggest that energy-, amino acid- and lipid-metabolism disorders occur in rats with damp-heat diarrhea which provide a scientific basis for elucidating the mechanism of pathogenesis of Chinese medicine and traditional Chinese veterinary medicine damp-heat diarrhea.

【Keywords】 damp-heat diarrhea; UPLC-Q/TOF-MS/MS; urine; metabolomics; biomarkers; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560709,31860717);国家肉牛/牦牛产业技术体系(CARS-37)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31560709,31860717),China Agriculture Research System-37(CARS-37).

【作者简介】 彭晓婷(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中兽医。Email: 1131703147@qq.com

【通信作者】 华永丽,女,副教授。Email: huayongli2004@163.com;魏彦明,教授,博士生导师。Email: weiyym@gsau.edu.cn。

* 共同通信作者

湿热泄泻 (dampness-heat diarrhea, DHD) 是中(兽)医泄泻疾病常见证型之一, 症见腹痛泄泻, 泻下急迫; 泄而不爽, 粪黏腻恶臭; 烦渴, 尿色黄无力, 舌苔黄腻, 脉濡数或滑数^[1-3]。DHD 四季发病, 病因复杂, 多有外感湿热毒邪、饮食不洁、外感疫疔、喜食肥甘厚腻等^[4-5]。DHD 缠绵难治易复发, 每年可造成巨大经济损失, 因此 DHD 发病机制的研究意义重大。

代谢组学技术应用广泛, 利用代谢组学技术可研究疾病发病机制、发现疾病生物标记物及监测疾病等^[6-7]。本研究采用高糖高脂+高温高湿+产肠毒性大肠杆菌复制大鼠湿热泄泻模型, 分析湿热泄泻潜在代谢标志物与发病机制的关系, 为研究湿热泄泻发病机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 20 只, 雌雄各半, 5~6 周龄, 180~220 g, 由兰州大学实验动物中心提供【SCXK(甘) 2015-0006】, 饲养条件: 温度 (22±2)℃、湿度 50%±5%、12 h 光照 12 h 黑暗, 代谢笼中适应 3 d。动物实验程序与福利均符合实验动物伦理学要求(伦理批准编号: GSAU-AEW-2018-0618)。

1.1.2 菌种

产毒性大肠杆菌标准株(O101), 由中国微生物菌种保藏管理中心(北京)提供, 菌号: CVCC231。

1.1.3 实验试剂与仪器

色谱级甲醇 (Tedia, 17115181); 色谱级甲酸 (Merck, H6070170); 色谱级乙腈 (Merck, 10900830); 56 度红星二锅头 (北京红星股份有限公司); 蜂蜜 (上海冠生园蜂制品有限公司, GB14963); 市售猪油; 戊巴比妥钠 (Sigma-Aldrich, P3761); 白细胞介素 6 (IL-6)、白介素 1β (IL-1β)、白细胞介素 2 (IL-2) 及肿瘤坏死因子 α (TNF-α) ELISA 检测试剂盒 (北京奇松生物科技有限公司, QS20180329、QS20180413、QS20180426、QS20180411)。

质谱仪 (SYNAPT G2 XS QTOF, Waters, 美国); 超高效液相色谱仪 (2777C UPLC system, Waters, 美国); 大鼠代谢笼; 酶标仪 (iMark, BIO-RAD, 美国); 全自动五分类动物血液细胞分析仪 (BC-5300Vet, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验

按本实验室前期建立的湿热泄泻模型复制方法建立湿热泄泻大鼠模型^[8]。20 只大鼠随机分为对照组 (control) 与 DHD 模型组 (model), 每组各 10 只。模型复制分三个阶段, 共 18 d。第一阶段: 高糖高脂 (HF), 10 d, 双日禁食, 单日饲喂普通饲料, 按体重 4 mL/200 g 灌胃猪油一次。第二阶段: 高温高湿 (HH), 5 d, 每天按体重 2 mL/200 g 灌胃白酒一次, 置于高温高湿仓 8 h, 温度 (33±2)℃, 湿度 (93±2)%。第三阶段: 攻毒 (EC), 3 d, 产毒性大肠杆菌 (1.06×10⁹ CFU/mL) 按体重 0.2 mL/200 g 间隔 24 h 腹腔注射两次, 正常饲养 1 d。实验中, 模型组大鼠自由饮用蜂蜜水 (30%), 正常饲养对照组大鼠, 灌胃、腹腔注射等体积生理盐水。

1.2.2 样本采集与制备

观察记录大鼠一般行为学变化, 包括精神状态、被毛、体温、饮食、尿液与粪便等。

实验结束用 1% 戊巴比妥钠按体重 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉采血。回肠与结肠各采 1 cm, 用 4% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色, 显微照相系统采集照片。

容器内加 0.5 mL 防腐剂 (2% NaN₃), 收集第 10 天、第 15 天、第 18 天 (各阶段末天) 对照组和模型组大鼠的尿液, -80℃ 保存。

尿液样本的制备: 各取 100 μL 尿液样本混合制作 QC 样本。从所有样本 (含 QC) 各取 100 μL 加入 300 μL 甲醇混匀, 涡旋 30 s, 静置 1 min 后 4℃ 25 000 r/min 离心 10 min, 取 20 μL 上清液与 180 μL 复溶液混匀, 0.22 μm 滤膜滤过备用。

1.2.3 指标检测

检测血常规: WBC、RBC、PCV、MO、PLT、LY、HGB。

严格按说明书要求检测细胞因子 IL-6、IL-1β、IL-2 及 TNF-α。

采用 SPSS 21.0, 组间数据差异显著性采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

1.2.4 UPLC-Q/TOF-MS/MS 分析条件

色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters, 美国); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B); 梯度洗脱条件: 0~1 min: 99% A; 1~3 min: 1%~15% B; 3~6 min: 15%~50% B; 6~9 min: 50%~95% B; 9~10 min: 95% B; 10~12 min: 99% A。柱温: 40℃; 流速:

0.5 mL/min;进样量:10 μL。

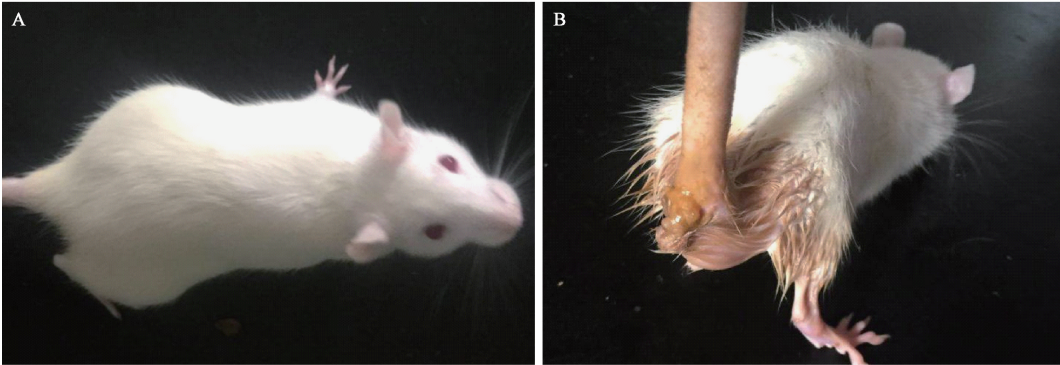
质谱条件 正离子与负离子模式应用高分辨串联质谱 SYNAPT G2-XS QTOF 进行样本分析和数据采集。正离子模式采集条件:毛细管电压 0.25 kV, 锥孔电压 40 V。负离子模式采集条件:毛细管电压 2 kV, 锥孔电压 40 V。数据采集: MSE 模式 centroid,一级扫描范围: 50 ~ 1200 Da, 扫描时间: 0.2 s, 20~40 eV 能量碎裂母离子采集碎片信息, 采集过程中每 3 s 对 LE 信号进行实时质量校正, 使用 QC 样品进行控制。

1.3 统计学分析

用 Progenesis QI 软件对原始质谱数据进行峰提取、对齐、匹配和强度校正等处理, 将得到的数据导入 MetaboAnalyst 在线软件进行多元分析, 单变量分析采用 *t* 检验和变异倍数分析 (Fold change, FC), 多变量分析采用正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)。差异代谢物筛选条件: FC ≥ 1.2 或 FC ≤ 0.8, *q* < 0.05, VIP ≥ 1.0。

2 结果

2.1 大鼠临床表现及模型评价



注: A: 对照组; B: DHD 模型组。

图 1 大鼠临床症状

Note: A: Control group; B: DHD group.

Figure 1 Clinical symptoms of the rats

表 1 血常规检测

Table 1 Results of blood routine test								
组别 Groups	白细胞 WBC (10 ⁹ /L)	嗜中性粒细胞 NE (10 ⁹ /L)	单核细胞 MO (10 ⁹ /L)	淋巴细胞 LY (10 ⁹ /L)	红细胞 RBC (10 ¹² /L)	血红蛋白浓度 HGB (g/L)	红细胞压积 PCV (%)	血小板 PLT (10 ⁹ /L)
对照组 Control group	14.961±4.064	4.470±1.895	1.710±0.998	4.750±0.673	6.980±1.327	137.640±10.586	40.050±7.166	1154.910±120.102
模型组 Model group	36.740±12.073 *	16.540±1.969 *	8.890±4.803 *	10.780±1.886 *	11.740±0.987 *	222.220±24.793 *	62.880±3.772 *	635.110±232.382 *

注: 与对照组相比, **P* < 0.05。
Note. Compared with the control group, **P* < 0.05.

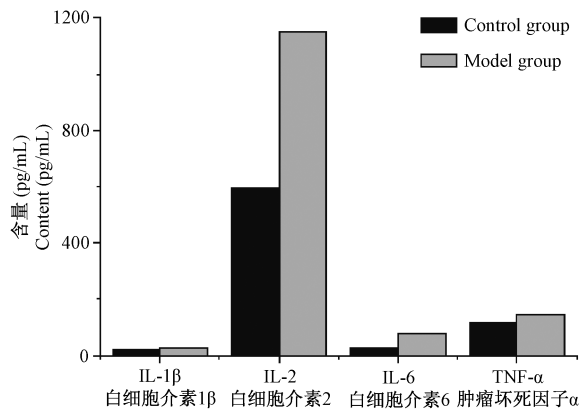


图 2 促炎细胞因子含量
Figure 2 Serum inflammatory cytokines levels of the rats

2. 1. 4 组织病理学

DHD 模型大鼠回肠和结肠部分粘膜上皮细胞坏死脱落,偶见中性粒细胞浸润。如图 3 所示,对照组大鼠肠粘膜上皮完整性较好,模型大鼠回肠肠绒毛部分上皮脱落,隐窝中有中性粒细胞浸润,结肠上皮细胞部分坏死脱落,粘膜下层结缔组织结构消失,小肠腺周围有中性淋巴细胞浸润。

2. 2 代谢轮廓分析

如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠尿液样

本峰强和峰型在 HF、HH 和 EC 三个阶段都有一定差异,提示 DHD 模型大鼠尿液中的代谢物在实验中均发生紊乱。

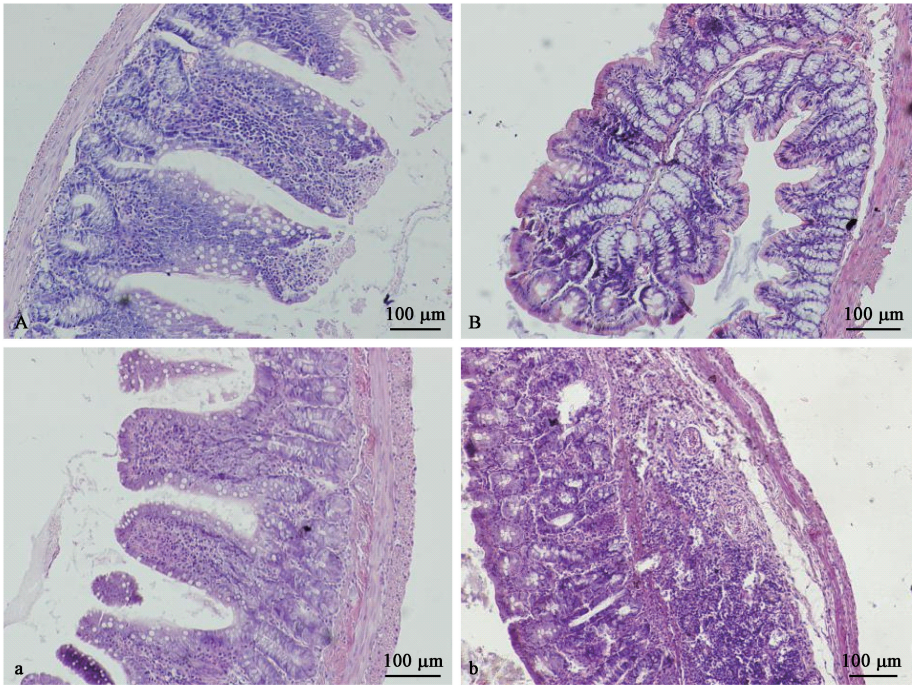
2. 3 模式识别分析

代谢数据 PLS-DA 分析见图 5,在正离子模式与负离子模式,对照组大鼠与模型组大鼠尿液样本点在不同阶段分离良好。DHD 模型大鼠尿液代谢物变化趋势在 HF、HH 和 EC 三个阶段都有差异,表明模型大鼠体内代谢水平因造模因素的影响而发生改变。

进一步进行 OPLS-DA 分析,见图 6。正离子模式 R2Y 是 0. 956、0. 877、0. 931,Q2 是 0. 925、0. 843、0. 896,负离子模式 R2Y 是 0. 930、0. 871、0. 928,Q2 是 0. 895、0. 834、0. 914。模型组大鼠尿液样本点在不同阶段均表现明显分离聚类,说明 DHD 模型大鼠代谢谱发生改变。利用 KEGG、METLIN、HMDB 等数据库共筛选出 102 个差异代谢物。

2. 4 差异代谢物鉴定

对代谢数据进行样本点间层次聚类分离,如图 7 所示,与对照组相比,模型组大鼠不同阶段尿液代谢状态在正离子模式和负离子模式均明显偏离。

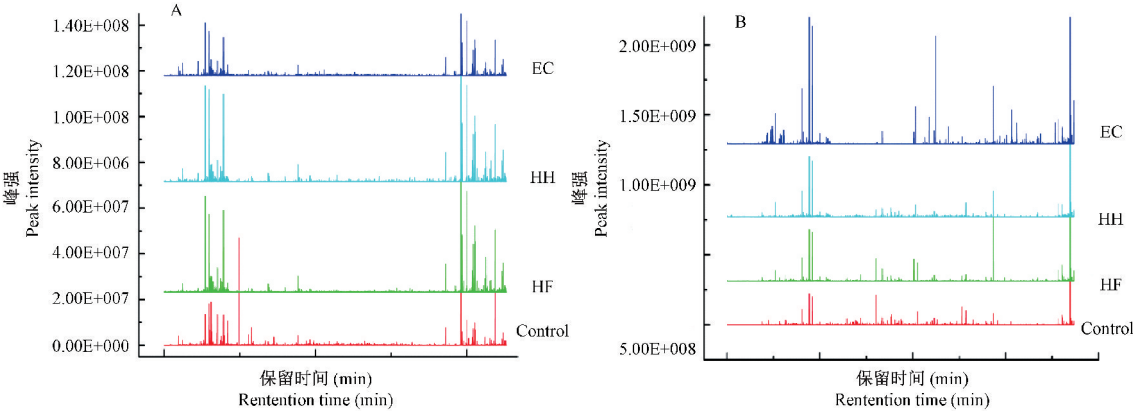


注:A.对照组回肠。a.模型组回肠。B.对照组结肠。b.模型组结肠。

图 3 回肠与结肠组织的病理变化

Note.A, Ileum of a control rat. a, Ileum of a dampness-heat diarrhea (DHD) rat. B, Colon of a control rat. b, Colon of a DHD rat.

Figure 3 Histopathological changes of the rat ileum and colon tissues

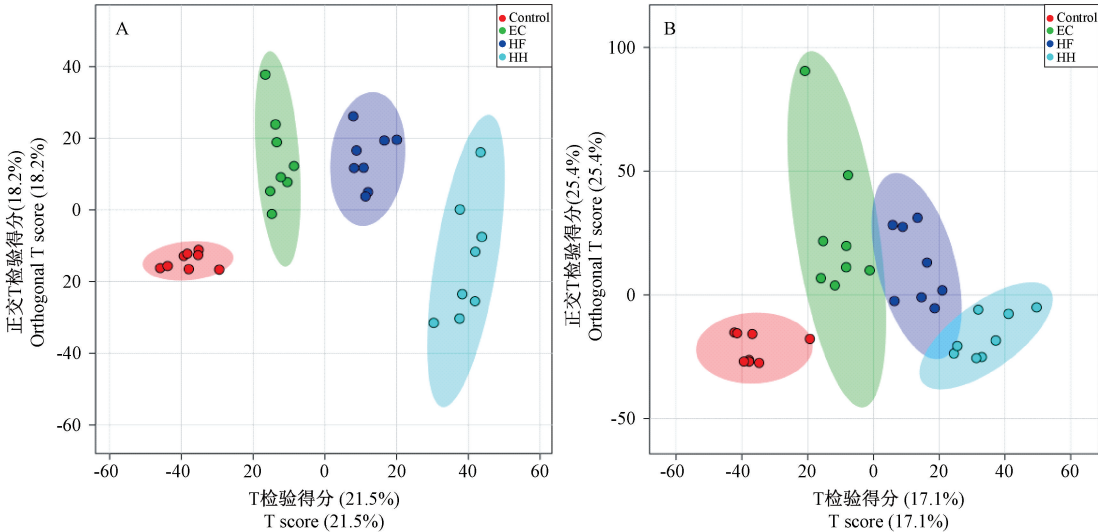


注:A.正离子模式。B.负离子模式。

图 4 总离子流图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 4 The total ions chromatograms (TIC) showing the urine changes of the rats



注:A: 正离子模式。B: 负离子模式。

图 5 PLS-DA 得分图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 5 The PLS-DA scores

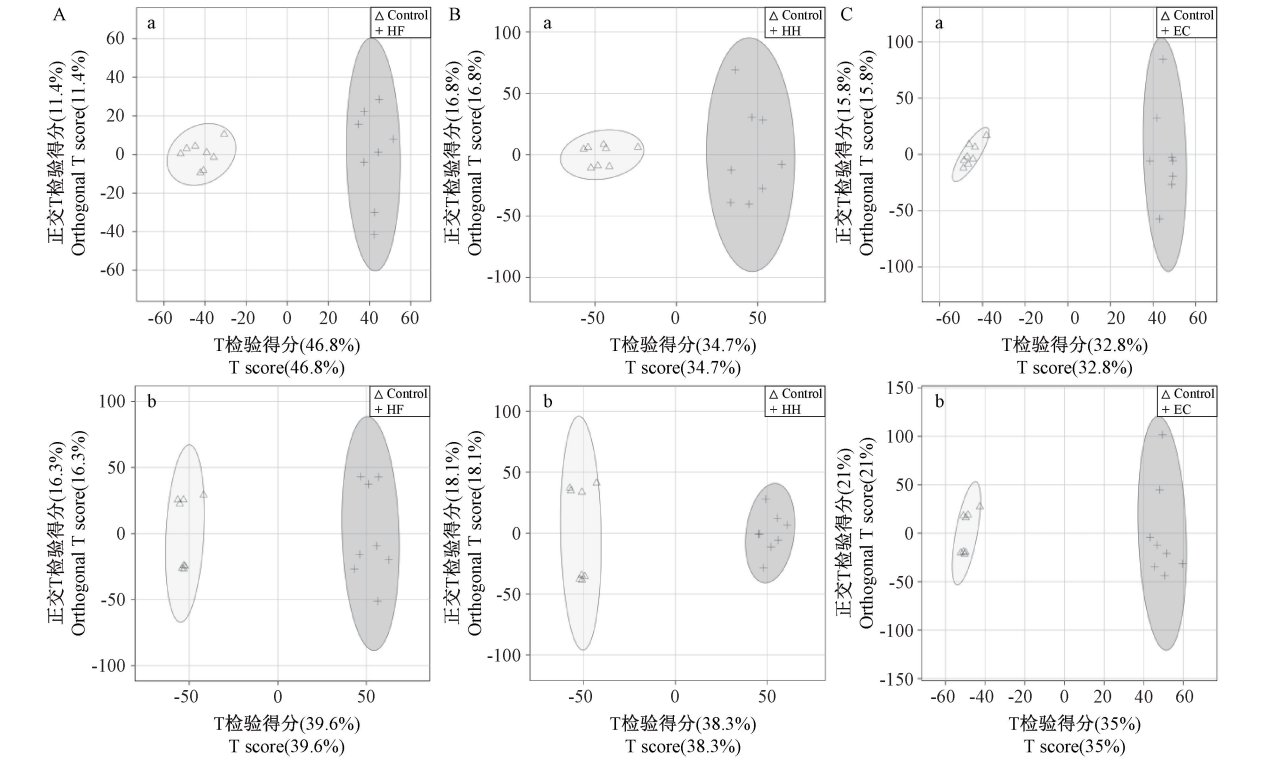
不同阶段尿液差异代谢物 Venn 分析见图 8,正离子模式鉴定出差异代谢物 57 个,14 个为两个或三个阶段共有;负离子模式鉴定出差异代谢物 20 个,5 个为两个或三个阶段共有。如表 2,有 7 种差异代谢物为三个阶段共有可作为潜在代谢标志物,分别是 5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋谷酰基-左旋半胱氨酸、左旋甲酰犬尿氨酸、亚油酸、褪黑素、核黄素-5-磷酸和左旋色氨酸。

2.5 代谢通路分析

应用 MetaboloAnalyst 构建代谢通路,见图 9, DHD 模型大鼠体内亚油酸代谢、核黄素代谢和色氨酸代谢等代谢通路均发生改变,涉及脂类、能量和氨基酸代谢。

2.6 潜在代谢标志物含量差异分析

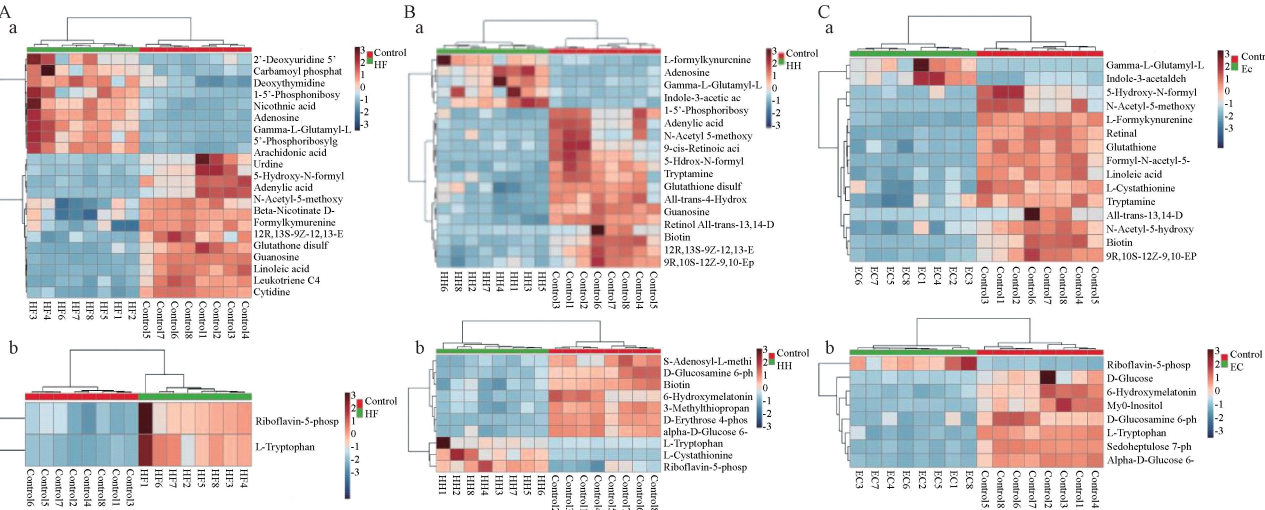
将数据归一化处理,以峰强度比较不同阶段潜在代谢标志物相对含量变化,如图 10,相较对照组,模型组大鼠尿液样本中褪黑素、亚油酸、左旋甲酰犬尿氨酸和 5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸含量明显降低 ($P < 0.05$),左旋色氨酸、核黄素-5-磷酸和左旋谷酰基-左旋半胱氨酸含量明显升高 ($P < 0.05$)。左旋色氨酸、核黄素-5-磷酸和左旋谷酰基-左旋半胱氨酸的含量在实验三个阶段表现明显的升高、降低和再升高变化;5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、褪黑素、亚油酸和左旋甲酰犬尿氨酸的含量呈现明显的下降、升高和再下降变化。提示模型复制过程中,内源性代谢物相对含量随造模因素改变而改变。



注:A:对照组与高糖高脂组。B:对照组与高温高湿组。C:对照组与攻毒组。a:正离子模式。b:负离子模式。

Figure 6 The OPLS-DA scores

Note. A, Control and HF. B, Control and HH. C, Control and EC. a, ESI+ mode. b, ESI- mode.



注:A:对照组与高糖高脂组。B:对照组与高温高湿组。C:对照组与攻毒组。a:正离子模式。b:负离子模式。

Figure 7 The heatmap of differential metabolites

Note. A, Control and HF. B, Control and HH. C, Control and EC. a, ESI+ mode. b, ESI- mode.

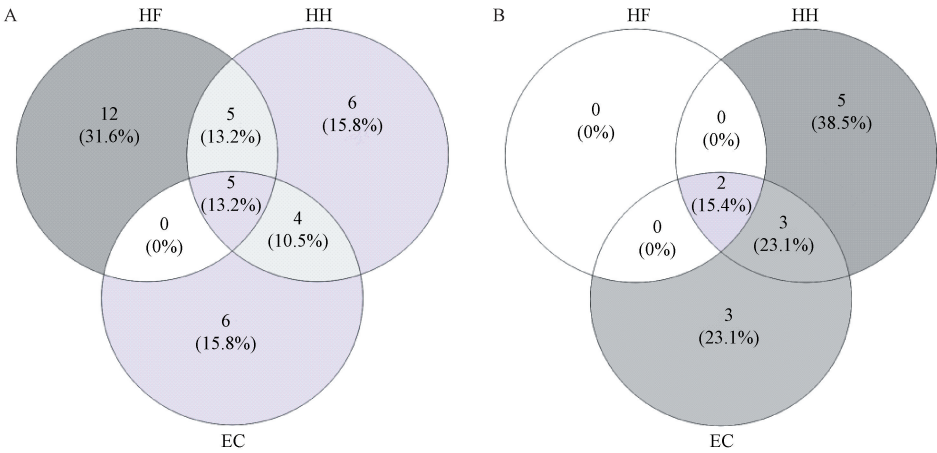
3 讨论

湿热泄泻病因复杂,有外感湿热致内生湿热、饮食不洁、喜食肥甘厚腻或外感疫疠等,病位多在大肠,

本实验模型大鼠回肠和结肠粘膜上皮完整性被破坏,表明湿热泄泻可造成肠道损伤,与中医理论一致。现代研究认为“外湿+内湿+生物致病因子”能理想的模拟湿热泄泻的复杂病因及病程^[9]。尿液比其他体液

易获取,蛋白质、脂质含量较少,基本包含机体各种代谢物及代谢过程,是较为理想的代谢组学研究样本^[10]。本实验各阶段模拟不同致病因素,应用尿液代谢组学技术,筛选出核黄素-5-磷酸、左旋甲酰犬尿

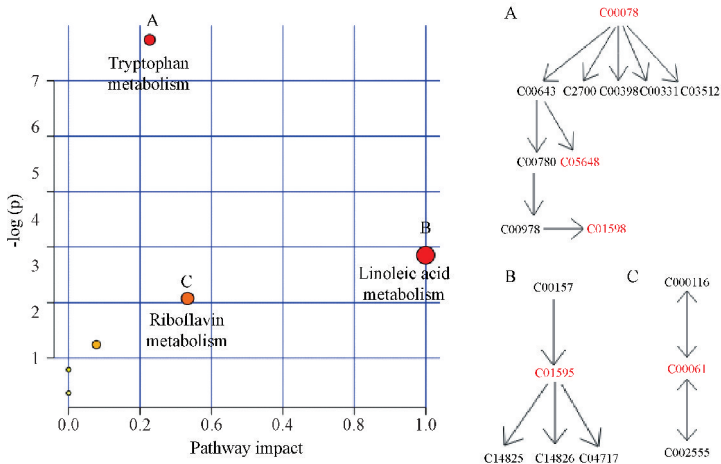
氨酸、5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋色氨酸、褪黑素、左旋谷氨酰基-左旋半胱氨酸和亚油酸等 7 个潜在代谢标志物,涉及核黄素代谢、色氨酸代谢、亚油酸代谢等代谢通路。



注:A:正离子模式。B:负离子模式。
图 8 差异代谢物 Venny 图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 8 The Venn diagram of differential metabolites



注:A:色氨酸代谢。B:亚油酸代谢。C:核黄素代谢。

图 9 相关代谢通路

Note. A, Tryptophan metabolism. B, Linoleic acid metabolism. C, Riboflavin metabolism.

Figure 9 The relevant metabolic pathways

表 2 DHD 尿液潜在生物标记物

Table 2 The potential urine biomarkers of dampness-heat diarrhea

质子数/电荷数	变异倍数	P 值	变量影响重要性因子	名称	编号
m/z	FC	P value	VIP	Description	KEGG.ID
270. 1079	0. 2409	0. 000474	1. 6382	5-Hydroxy-N-formylkynurenine	C05648
250. 0615	8. 6343	0. 000006	2. 3394	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	C00669
275. 0436	0. 4444	0. 015793	1. 0034	L-Formylkynurenine	C02700
271. 0828	0. 0528	0. 000020	2. 6819	N-Acetyl-5-methoxytryptamine	C01598
239. 0582	2. 7867	0. 000000	1. 1523	L-Tryptophan	C00078
303. 2295	0. 1279	0. 000040	2. 0437	Linoleic acid	C01595
455. 0952	2. 8492	0. 001579	1. 1831	Riboflavin-5-phosphate	C00061

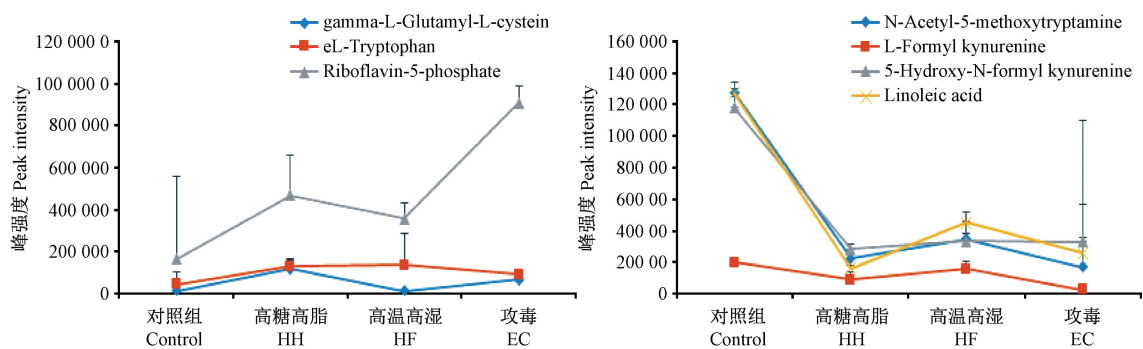


图 10 潜在代谢标志物含量变化
Figure 10 Changes in the content of potential metabolic markers

3.1 核黄素代谢

核黄素-5-磷酸是体内核黄素存在形式,其含量变化提示核黄素代谢改变。核黄素即 VB2,是 FMN 和 FAD 两种辅酶的主要活性基因,FMN 和 FAD 参与机体蛋白质、脂质、糖类和核酸代谢^[11]。核黄素代谢异常与多种疾病有关,如发热、炎症,研究发现核黄素-5-磷酸含量升高可能是机体发生强烈氧化代谢^[12-14]。本研究 DHD 大鼠尿液核黄素-5-磷酸含量在 HF、EC 阶段明显上升,表明高糖高脂与攻毒使大鼠发生强氧化代谢。

3.2 色氨酸代谢

左旋甲酰犬尿氨酸、5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋色氨酸和褪黑素的含量变化反映色氨酸代谢改变。色氨酸是血清素前体,其代谢主要发生在炎症组织,研究表明抗原递呈细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和炎性细胞因子通过释放活化的免疫细胞,促进吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 的活化及表达加速色氨酸降解^[15-16]。色氨酸代谢与炎症性肠病密切相关,其在胃肠道代谢有三种主要途径^[17]。(1) 肠道微生物将色氨酸转化为几种分子,包括芳烃受体 (AhR) 的配体,AhR 信号传导被认为是屏障部位免疫反应的关键组成部分,通过作用于上皮细胞更新影响屏障完整性和免疫细胞增殖,对肠内稳态至关重要^[18]。(2) IDO 在免疫细胞和上皮细胞中的犬尿氨酸途径 (KP),通过肠道中 KP 进行色氨酸代谢由限速酶 IDO1 介导,产生犬尿氨酸 (Kyn) 和下游产物,犬尿氨酸代谢产物浓度随胃肠道增加,通过 G 蛋白偶联受体 GPR35 表现粘膜保护和免疫调节作用^[19-20]。(3) 色氨酸羟化酶 1 (TpH1) 在肠嗜铬细胞中的 5-羟色胺 (5-HT) 途径。5-HT 是影响肠道信号传导的重要信号分子,间接影响肠道蠕动、分泌、血管舒张和吸收^[21]。DHD 大鼠尿液色氨酸水平显

著降低,三种关键的色氨酸代谢物 (Kyn, 5-HT 和 5-HTP) 的水平显著增加,表明大鼠肠道蠕动、舒张和吸收均受到影响。

3.3 亚油酸代谢

亚油酸参与细胞生长、凋亡及免疫调控,有降胆固醇和降低心血管疾病与乳腺癌风险的作用^[22-23]。亚油酸可生成花生四烯酸,花生四烯酸是某些促炎类物质前体,如 PGE2、LTB4、TXA2,促炎类花生酸可促进 IL-6、TNF- α 、CRP 的生成^[24-25]。本试验 IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 四种促炎细胞因子均升高,结合血常规检测结果提示机体发生炎症反应。DHD 大鼠尿液中亚油酸含量明显降低,可能是由于机体炎症反应消耗能量降低亚油酸水平^[26]。尿液中亚油酸浓度降低意味着能量供需不平衡,与所致炎症不良结果相关。

DHD 可能是动物受外界致病因素影响,体内免疫细胞通过某些途径诱导炎症因子活化,造成体内色氨酸代谢、核黄素代谢与亚油酸代谢等代谢通路发生改变,进而使机体整个代谢系统发生紊乱,从而引起 DHD 的发病。

参 考 文 献 (References)

[1] 夏春霞,童佳.枫蓼肠胃康胶囊治疗湿热泄泻的临床观察 [J].吉林中医药, 2010, 30(2): 138-139.
Xia CX, Tong J. Clinical observation of Fengqi Changweikang capsule in treating damp heat diarrhea [J]. Jilin J Chin Med, 2010, 30(2): 138-139.
[2] 王涛.两种不同方法建立大鼠湿热泄泻模型的比较研究 [D].兰州:甘肃农业大学, 2016.
Wang T. Competitive study of damp heat diarrhea rat model established with different methods [D]. Lanzhou: Gansu Agr Univ, 2016.
[3] 李文龙,彭芝配,张金慧,等.建立湿热泄泻大鼠模型初探 [J].中国医药指南, 2012, 10(11): 108-109.
Li WL, Peng ZP, Zhang JH, et al. Establishment of a rat model

- of damp heat and diarrhea [J]. Guide Chin Med, 2012, 10 (11): 108-109.
- [4] 刘玲, 王晓燕, 李晶. 清肠止泻煎剂结肠滴注治疗小儿湿热泄泻临床观察 [J]. 中医临床研究 2016, 8(19): 86-88.
- Liu L, Wang XY, Li J. Clinical observation on treating infantile diarrhea of the Shi're type with the Qingchang Zhixie decoction [J]. Clin J Chin Med, 2016, 8(19): 86-88.
- [5] 张芳, 王会丽, 王莉. 黄连解毒汤配合贴敷治疗湿热泄泻 60 例 [J]. 江西中医药, 2001, 32(6): 27.
- Zhang F, Wang HL, Wang L. Treating 60 cases of damp-heat and diarrhea with Huanglian Jiedu Decoction and Adhesive [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2001, 32(6): 27.
- [6] 邹忠杰, 谢媛媛, 龚梦鹃, 等. 巴戟天补肾阳作用的尿液代谢组学研究 [J]. 药科学报, 2013, 48(11): 1733-1737.
- Zou ZJ, Xie YY, Gong MJ, et al. Urine metabolomic study of intervention effects of *Morinda officinalis* How. on 'Kidney-yang deficiency syndrome' [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48 (11): 1733-1737.
- [7] 张晓松, 马琪, 文艳巧, 等. 苦豆草治疗大肠湿热证大鼠血清代谢组学研究 [J]. 药科学报, 2018, 53(1): 111-120.
- Zhang XS, Ma Q, Wen YQ, et al. Sophora alopecuroides ameliorates large intestine dampness-heat syndrome in rats by serum metabolomic approach based on UHPLC-Q/TOF-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(1): 111-120.
- [8] Yao WL, Yang CX, Wen YQ, et al. Treatment effects and mechanisms of Yujin Powder on rat model of large intestine dampness-heat syndrome [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202: 265-280.
- [9] 李文龙. 秦香止泻方对湿热泄泻的临床疗效观察及作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- Li WL. Study on clinical curative effects and mechanism of damp-heat diarrhea with QinXiang Anti-diarrhea [D]. Changsha: Hunan Univ Chin Med, 2011.
- [10] Emwas AH, Luchinat C, Turano P, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review [J]. Metabolomics, 2015, 11(4): 872-894.
- [11] 仪宏, 朱文众, 张华峰. 核黄素的产业现状及其对策 [J]. 中国食品添加剂, 2003, 14(3): 10-12, 20.
- Yi H, Zhu WZ, Zhang HF. Industrial situations on riboflavin production and strategy [J]. Chin Food Addit, 2003, 14(3): 10-12, 20.
- [12] Guo XY, Guo MX, Li Q, et al. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e10001.
- [13] Olex AL, Turkett WH, Fetrow JS, et al. Integration of gene expression data with network-based analysis to identify signaling and metabolic pathways regulated during the development of osteoarthritis [J]. Gene, 2014, 542(1): 38-45.
- [14] Jia X, Hildrum KI, Westad F, et al. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics [J]. J Proteome Res, 2006, 5(7): 1763-1769.
- [15] Harden JL, Lewis SM, Lish SR, et al. The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(6): 1830-1840.
- [16] Zou MH. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation and immune activation [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2015, 20(7): 1116-1143.
- [17] Qu C, Yuan ZW, Yu XT, et al. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism [J]. Pharmacol Res, 2017, 121: 70-82.
- [18] Zelante T, Iannitti R, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 [J]. Immunity, 2013, 39 (2): 372-385.
- [19] Clarke G, Grenham S, Scully P, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner [J]. Mol Psychiatry, 2012, 18(6): 666-673.
- [20] Guo J, Xu K, Liu HG, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 13.
- [21] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(6): 716-724.
- [22] Jandacek RJ. Linoleic acid: A nutritional quandary [J]. Healthcare (Basel), 2017, 5(2): E25.
- [23] 张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展 [J]. 粮油加工, 2010, 41(5): 18-21.
- Zhang CE, Zhang H, Liu CY, et al. Research progress of linoleic acid [J]. Cereals Oils Process, 2010, 41(5): 18-21.
- [24] Vangaveti VN, Holger J, Lee KR, et al. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 785: 70-76.
- [25] Fritsche KL. Linoleic acid, vegetable oils & inflammation [J]. Mo Med, 2014, 111(1): 41-43.
- [26] Mathers L, Bailey MJ. Enzyme deletions and essential fatty acid metabolism in cultured cells [J]. J Biol Chem, 1975, 250(3): 1152-1153.