

朱华,郭亚茜,杜晓鹏,等. 基于 LC-MS 的冠心病病人源菌群小鼠代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 323-329.
Zhu H, Guo YX, Du XP, et al. Metabolic analysis of human flora-associated mice with coronary heart disease using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 323-329.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.005

基于 LC-MS 的冠心病病人源菌群小鼠代谢组学研究

朱华,郭亚茜,杜晓鹏,李卓,苏磊,秦川*

(卫健委人类疾病比较医学重点实验室,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,
北京 100021)

【摘要】 目的 使用基于液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)的非靶向代谢组学技术研究冠心病病人源菌群小鼠特征性代谢产物。**方法** 28只无菌雌性 C57BL/6J 小鼠分为对照组(CON)和模型组(CAD),分别接种健康志愿者和冠心病患者的新鲜粪便悬液,移植后6周和10周每组安乐7只动物采集血浆,使用 LC-MS 技术对小鼠的血浆代谢物进行研究,运用 PCA 和 PLS-DA 统计学方法鉴别特征代谢物及相关代谢通路。**结果** 最终通过标准品确认30个在2个时间点均存在的特征性差异代谢物。其中 L-肉毒碱、苯丙酮酸、1-萘酚、2-萘酚在模型组显著升高。胆汁酸代谢通路、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢途径在建模6周、10周均下调。**结论** 冠心病病人源菌群小鼠出现与患者类似的代谢紊乱。

【关键词】 冠心病;菌群人源化动物;气相-液相色谱联用;代谢组学

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0323-07

Metabolic analysis of human flora-associated mice with coronary heart disease using liquid chromatography-mass spectrometry

ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LI Zhuo, SU Lei, QIN Chuan*

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

Corresponding author: QIN Chuan. E-mail: chuanqin@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To use liquid chromatography-mass spectrometry based plasma metabolomics to study the characteristics of human flora-associated (HFA) mice with coronary heart disease. **Methods** Twenty-eight female germ free C57BL/6J mice were divided into healthy control and coronary heart disease (CAD) groups. Each mouse was orally inoculated with a stool suspension from healthy people or patients with CAD to establish the HFA mouse models. At 6 and 10 weeks after inoculation, plasma metabolites were studied and PCA and PLS-DA statistical method were used to identify the characteristic metabolites. **Results** The PCA, PLS-DA and variable importance in projection analysis identified 30 characteristic metabolites present at 6 and 10 weeks after inoculation; structural identification found that L-carnitine, phenylpyruvic acid, and 1-naphthol, 2-naphthol were significantly higher in the CAD group compared with the control group. These potential biomarkers were related to the bile acid pathway and glycine, serine, threonine pathway. **Conclusions** The metabolism disorder in HFA mice appears similar to that of patients with CAD.

【Keywords】 coronary heart disease; human flora associated animal; LC-MS; metabolomics

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

[基金项目] 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science (CIFMS, 2017-12M-2-005)。

[作者简介] 朱华,主任技师,研究方向:疾病与肠道微生态。Email: zhuhua0226@vip.sina.com

[通信作者] 秦川,教授,博士生导师。研究方向:病理与病理生理学。Email: chuanqin@vip.sina.com

代谢组学是通过分析细胞或组织受遗传、环境等因素影响产生的小分子代谢物的变化规律,识别不同病理生理同状态下的差异代谢产物,进而推测正常或疾病时机体代谢的生理病理机制^[1-2]。冠心病作为一种常见的心血管疾病,由于基因与基因、基因与环境的相互作用导致存在大量特征性代谢产物及相关代谢通路,其病理生理机制与代谢性密切相关^[3-4]。对冠心病患者及相关动物模型的粪便、血液等进行代谢组学分析,了解其发生、发展进程中伴随的小分子物质的生物学变化,发现可能相关的代谢标志物,研究其病理机制,对冠心病早期筛查、诊断、疾病进展监测、治疗效果评估和预后评价等各个方面都具有重要意义^[5-6]。目前主要的代谢组技术平台主要有气相色谱-质谱(GC+MS),液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等。其中 LC-MS 具有灵敏度高、分离效率高、数据库完整易于分析等优点^[7-8]。LC-MS 法主要检测挥发性的低分子化合物,样品用量少,可同时检测几百种化合物,目前已被广泛用于心血管疾病、胃肠道疾病、糖尿病、肿瘤等多种疾病及药理、毒理、营养等方面的研究。课题组在前期工作中已成功建立冠心病菌群人源化小鼠模型,本研究在此基础上,通过 LC-MS 对模型小鼠进行血浆的非靶向代谢组学研究,从代谢组学角度探讨肠道菌群与冠心病发生、发展的关系,寻找其可能存在的新干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型

实验使用的动物为课题组自己繁育的无菌 C57BL/6J 小鼠,雌性,饲养于无菌隔离器,实验动物使用许可证号【SYXK(京)2018-0019】。饲养条件:温度 21 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗比 12h:12h。实验获得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准,批准号 ZH17001。模型建立方法见参考文献^[9]。

1.1.2 主要试剂与仪器

分析用甲醇、纯净水、乙腈、甲酸均为 Thermo 公司产品。主要仪器:质谱仪(Thermo, QE HF-X),色谱仪(Thermo, Vanquish UHPLC),色谱柱(Thermo, Accucore HILIC column),低温离心机(Thermo, ST16R),真空冷冻干燥机(Labogene, Scan Speed 40)。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及处理

在粪菌移植 6 周、10 周后每组分别安乐 7 只动物,小鼠眼眶取血,肝素抗凝,1500 rpm/min 离心 10 min,分离血浆,无菌管分装后, -80℃ 保存待测。检测时取 100 μL 血浆样本置于 EP 管中,加 400 μL 80% 甲醇水溶液,漩涡震荡,室温静置 60 min 后 4℃ 15 000 rpm/min 离心 20 min。取上清于 1.5 mL 离心管中真空冷冻干燥。残留物用 100 μL 复溶剂溶解,漩涡震荡,4℃ 15 000 rpm/min 离心 15 min 取上清 100 μL 进行 LC-MS 分析。从处理好样本中取等量上清 100 μL 混匀做质控。选择实验样本的空白基质作为空白样本,处理方法与样本相同。

1.2.2 数据处理

将下机原始数据导入 CD 搜库软件做保留时间、质荷比等参数的初步筛选。然后对样品根据保留时间偏差 0.2 min、质量偏差 5 ppm 进行峰对齐,以提高鉴定准确度。随后根据设置的质量偏差 5 ppm、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小强度 100 000、加和离子等参数进行峰提取,对峰面积进行定量,整合目标离子预测化合物的分子式并与 mzCloud 数据库进行比对。空白样本用于去除背景离子,质控样本用于定量结果进行归一化,最终得到数据鉴定和定量结果。

1.3 统计学分析

数据分析使用 SPSS 22.0 统计软件。统计结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间差异使用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 分析方法验证

QC 样本的作用在于测试加样前仪器状态,评价实验过程中色谱-质谱系统的稳定性。QC 样本相关性数值越接近于 1 表示测试方法稳定性越好,数据质量越高。在正负离子 2 个模式下, QC 样本相关性最小值为 0.976,表明此次检测方法稳定,数据可信(图 1)。通过偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)获得模型评价参数(R^2 , Q^2), R^2 和 Q^2 值越接近 1,表示模型越稳定可靠;若 R^2 和 Q^2 小于 0.5,则表示模型可靠性较差。实验得到的模型相关评价参数为:6 周时 $R^2 = 0.66$, $Q^2 = 0.71$ (图 2A), 10 周时 $R^2 = 0.60$, $Q^2 = 0.97$ (图 2B),说明模型构建稳

定,数据可靠。

2.2 总样本主成分(PCA)分析

对采集到的数据进行 PCA 分析,可以看到实验组、对照组在正负离子分析模式中均被明显的分开(图 3),说明两组动物间代谢存在明显的差异。而每个组内不同时间节点则聚合的较好,说明在组内不同时间的代谢方面模型是稳定的(图 3)。

2.3 差异代谢产物的筛选与鉴定

本实验使用 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度(Variable Importance in the Projection, VIP)值结合 *t*-test *P* 值获得差异性表达代谢物。设置阈值为 VIP > 1.0,差异倍数 FC > 2.0 或 FC < 0.5 且 *P* value < 0.05,在建模 6 周时正离子模式筛选出差异代谢产物 476 个,其中上调 223 个,下调 253 个。10 周时正离子模式筛选出差异代谢产物 475 个,其中上调 193 个,下调 282 个。6 周负离子模式筛选出差异代谢产物 344 个,其中上调 152 个,下调 192 个。10 周负离子模式筛选出差异代谢产物 330 个,其中上调 104 个,下调 226 个(表 1)。

在 HMDB 数据库中找出对应的可能内源性物质,再在 PeakView 软件中找出这些可能物质相应的一级和二级质谱图,通过与数据库(HMDB, METLIN, MassBank 和 KEGG)中的一级和二级质谱图进行比对,最终通过标准品确认 30 个在 2 个时间点均存在的差异代谢物。其中 L-肉毒碱、苯丙酮酸、1-萘酚、2-萘酚在模型组显著升高(表 2)。

2.4 代谢通路分析

为进一步研究这 30 种差异代谢物与冠心病之间的关系,本研究通过 MetPA 3.0 进行代谢通路分析来确定与差异代谢物最为相关的代谢通路。最

终发现次级胆汁酸代谢通路(影响因子 0.33)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径(影响因子 0.31)这 2 个在建模 6 周、10 周 2 个时间点都发生改变的代谢通路(图 4)。且这两条代谢通路均为下调(图 5)。

3 讨论

本研究基于 LC-MS 技术对冠心病病人源菌群小鼠的血浆进行了非靶向代谢组学研究。在建模 6 周、10 周 2 个时间节点的 R² 和 Q² 值分别为 0.66、0.71 和 0.60、0.97,说明代谢模型构建成功,有良好的预测能力。在 PCA 分析中,CON 组和 CAD 组在正负离子模式下均被明显的区分开,而在组内不同阶段则聚合的较好,说明两组动物间的小分子物质代谢存在明显差异,但在组内代谢方面是稳定的。

通过多元统计数据分析,鉴定出包括 L-肉毒碱、苯丙酮酸、1-萘酚、2-萘酚在内的 30 种在 2 个时间节点都具有显著差异性的代谢物。这些代谢物主要包括苯和其取代的衍生物、核苷酸类、类固醇和类固醇衍生物类、羧酸及其衍生物类、胺类等。肉毒碱类代谢物在冠心病患者与对照人群中的差异几乎在所有有关冠心病代谢组学研究都被报道过。L-肉毒碱是一种来源于甲硫氨酸和赖氨酸生物合成的季铵化合物,在能量代谢,特别是脂肪酸分解代谢中发挥重要作用,它可以辅助转移长链脂肪酸通过线粒体内膜进入基质,通过促进其 β -氧化为心肌细胞提供所需能量^[10-12]。L-肉毒碱减少会导致脂肪代谢异常,血脂升高,加速动脉粥样硬化进程,促进冠心病的发生发展^[13-14]。本研究中也发现在不同时间节点模型组动物 L-肉毒碱水平的显著降低。与上述报道相符。

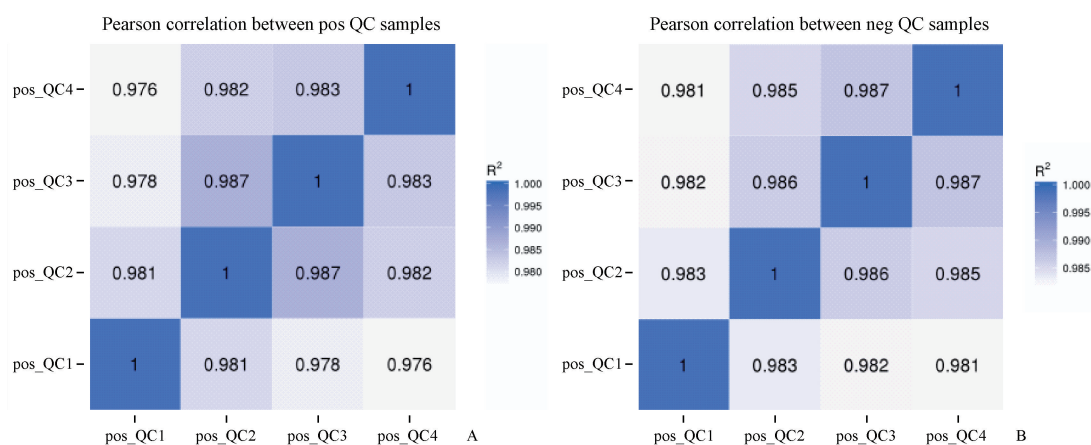
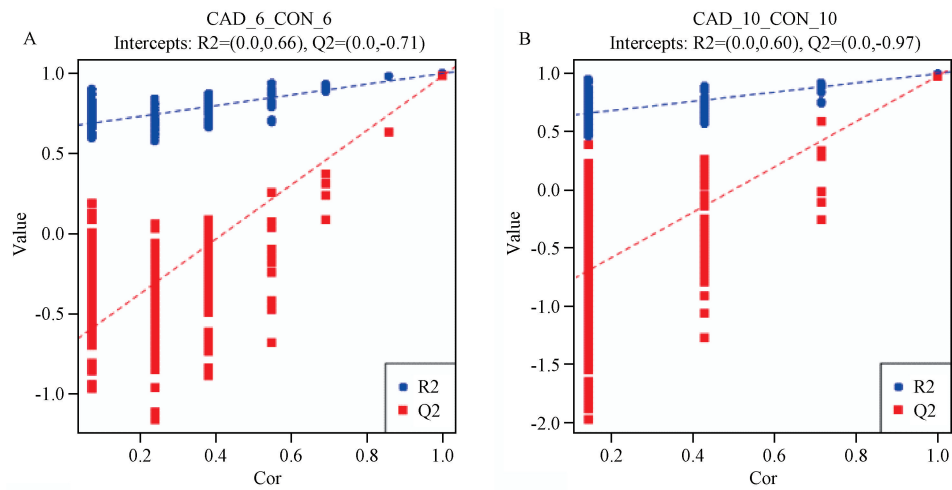
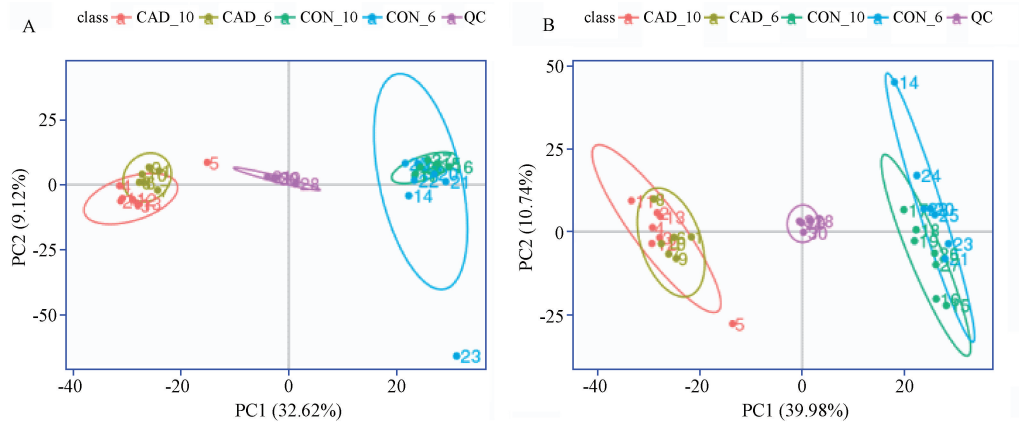


图 1 QC 样本相关性分析结果
Figure 1 Results of QC sample correlation analysis



注:A;正离子模式;B:负离子模式。
图 2 模型评价参数
Note. A, Positive ion mode; B, Negative ion mode.

Figure 2 Evaluation parameters of metabolic model



注:A;正离子模式;B:负离子模式。
图 3 总样品 PCA 分析
Note. A, Positive ion mode; B, Negative ion mode.

Figure 3 PCA of the QC samples

表 1 代谢物差异分析结果

Table 1 Results of metabolite differential analysis

组别 Compared samples	化合物总数 No. of total identification	差异显著代谢物数量 No. of total significance	显著上调代谢物数量 No. of significance up	显著下调代谢物数量 No. of significance down
6 周正离子模式 CAD_6.vs.CON_6_pos	2779	476	223	253
10 周正离子模式 CAD_10.vs.CON_10_pos	2779	475	193	282
6 周负离子模式 CAD_6.vs.CON_6_neg	1779	344	152	192
10 周负离子模式 CAD_10.vs.CON_10_neg	1779	330	104	226

表 2 特征性差异代谢产物

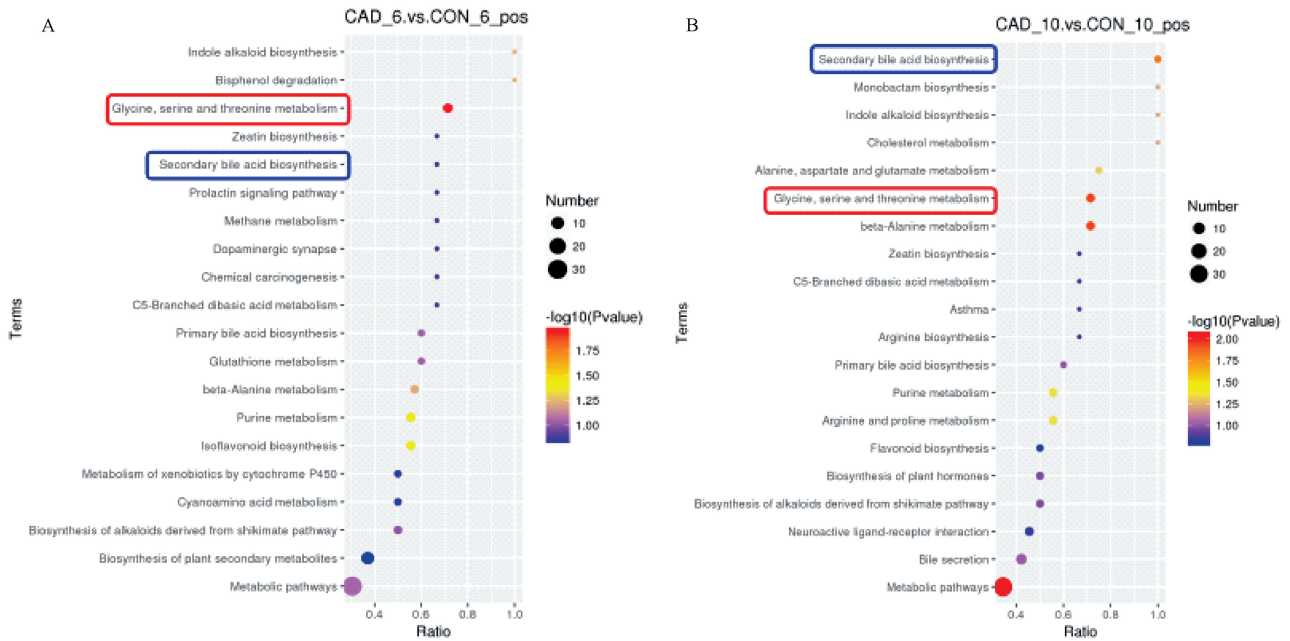
Table 2 Characteristic differential metabolites

编号 No.	离子模式 Ion model	代谢物描述 Name_des	分子式 Formula	保留时间 RT	变量投影重 要度 VIP	P 值 P value
1	Com_14_neg	rac-Etomidate	C14 H16 N2 O2	11. 412	3. 1391	0. 0002
2	Com_3623_neg	DL-Tryptophan	C11 H12 N2 O2	6. 094	2. 2281	0. 0017
3	Com_327_neg	4,5-Dihydroxy-4-(2,3,4-trihydroxytetrahydro-2-furanyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylic acid	C9 H13 N O8	1. 061	1. 7522	0. 0033
4	Com_328_neg	3-(acetamidomethylidene)-2-(hydroxymethyl) succinic acid	C8 H11 N O6	1. 072	1. 6741	0. 0024
5	Com_15140_neg	Imperatorin	C16 H14 O4	5. 93	2. 3206	0. 0037
6	Com_657_neg	Methyl-3,4,16-trihydroxy-1-methyl-6,7-didehydroaspidospermidine-3-carboxylate	C22 H28 N2 O5	8. 942	4. 0235	0. 0021
7	Com_6636_neg	PG(18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	C46 H81 O10 P	11. 661	1. 8279	0. 0006
8	Com_2172_neg	Lovastatin	C24 H36 O5	11. 877	2. 8856	0. 0067
9	Com_2210_neg	Sulfoglycolithocholic acid	C26 H43 N O7 S	9. 939	3. 1836	0. 0068
10	Com_844_neg	(11S,13S)-3-Amino-14-(hydroxymethyl)-8,10-dioxA-2,4-diazatetracyclotetradec-3-ene-5,9,12,13,14-pentol	C11 H17 N3 O8	0. 997	2. 2110	0. 0069
11	Com_2770_neg	1-Naphthol	C10 H8O	11. 333	2. 7010	0. 0001
12	Com_14828_neg	S(8)-glutaryl dihydroliipoamide	C13 H23 N O4 S2	7. 894	1. 8572	0. 0070
13	Com_3858_neg	Methyl O-sulfo-L-tyrosinate	C10 H13 N O6 S	5. 618	4. 1673	0. 0070
14	Com_741_neg	22-Ethyl-10,12,16,18-tetrahydroxy-17-methyloxacyclodocosA-3,5,7,13-tetraen-2-one	C24 H38 O6	11. 493	2. 0209	0. 0070
15	Com_1180_neg	fructosylglycine	C8 H15 N O7	1. 076	1. 6874	0. 0071
16	Com_14_neg	rac-Etomidate	C14 H16 N2 O2	11. 412	3. 1391	0. 0072
17	Com_1000_pos	3-(acetamidomethylidene)-2-(hydroxymethyl) succinic acid	C8 H11 N O6	1. 125	1. 2512	0. 0064
18	Com_10041_pos	Cyclohexyl phenyl ketone	C13 H16 O	8. 699	3. 0865	0. 0044
19	Com_10109_pos	Phenylpyruvic acid	C9H8O3	9. 113	3. 3079	0. 0000
20	Com_10266_pos	Beta-Naphthoxyacetic Acid	C12 H10 O3	6. 738	2. 7037	0. 0003
21	Com_1034_pos	L-Camitine	C7H15N03	1. 053	1. 8513	0. 0001
22	Com_10809_pos	Estradiol enanthate	C25 H36 O3	12. 604	1. 8846	0. 0034
23	Com_10874_pos	1-Hydroxy-5,8,11,14-icosatetraen-1-ylidene] amino] butanoic acid	C24 H39 N O3	11. 87	1. 2255	0. 0002
24	Com_10883_pos	Loperamide	C29 H33 Cl N2 O2	9. 836	1. 3648	0. 0165
25	Com_10924_pos	Trospium	C25 H29 N O3	8. 034	1. 6339	0. 0006
26	Com_10927_pos	2-Naphthol	C10 H8O	0. 938	2. 1903	0. 0000
27	Com_1103_pos	2,3-DiacetoxyursA-12,18-dien-28-oic acid	C34 H50 O6	15. 951	1. 4848	0. 0002
29	Com_1116_pos	Propiolic acid	C3 H2 O2	1. 148	1. 0783	0. 0022
30	Com_11269_pos	Pelitrexol	C20 H25 N5 O6 S	1. 131	1. 5599	0. 0008

为进一步研究这 30 种代谢物和冠心病之间的关系,通过代谢通路分析确定了与所选代谢物最为相关的代谢通路。最终发现次级胆汁酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢这 2 个通路在 6 周、10 周 2 个时间点都呈现下调趋势。甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径主要是促进磷酸肌酸和 ATP 合成;甘氨酸是内源性抗氧化剂还原性谷胱甘肽的组成氨基酸,在谷氨酸-半胱氨酸连接酶的催化下,消耗 ATP 产生 γ -谷氨酸半胱氨酸,然后在谷胱甘肽合成酶催化下,与甘氨酸结合合成谷胱甘肽。苏氨酸主要通过苏氨酸脱水酶、苏氨酸脱氢酶、苏氨酸醛缩酶催化转变为其他物质。处于氨基酸代谢中间位置的

丝氨酸则主要通过增加 NADPH 的合成,消除氧自由基的毒害作用,在维持细胞的存活中起重要作用^[15-17]。模型动物这条代谢通路下调,能量代谢降低,氧自由基、肉毒碱、丙酮类有害代谢产物增加。这与冠心病患者缺血缺氧使三羧酸循环(TCA)受抑制,能量供应不足的病理生理机制是吻合的。

胆汁酸不仅是参与脂类消化吸收的重要物质,也是调控糖脂和能量代谢的关键信号分子^[18]。胆汁酸以胆固醇为原料在肝脏中合成,通过肠肝循环在肠道中代谢。胆汁酸与肠道菌群之间存在着相互作用的关系。肠道菌群可促进食物中营养物质的吸收,并产生大量代谢物通过相应的受体间接调

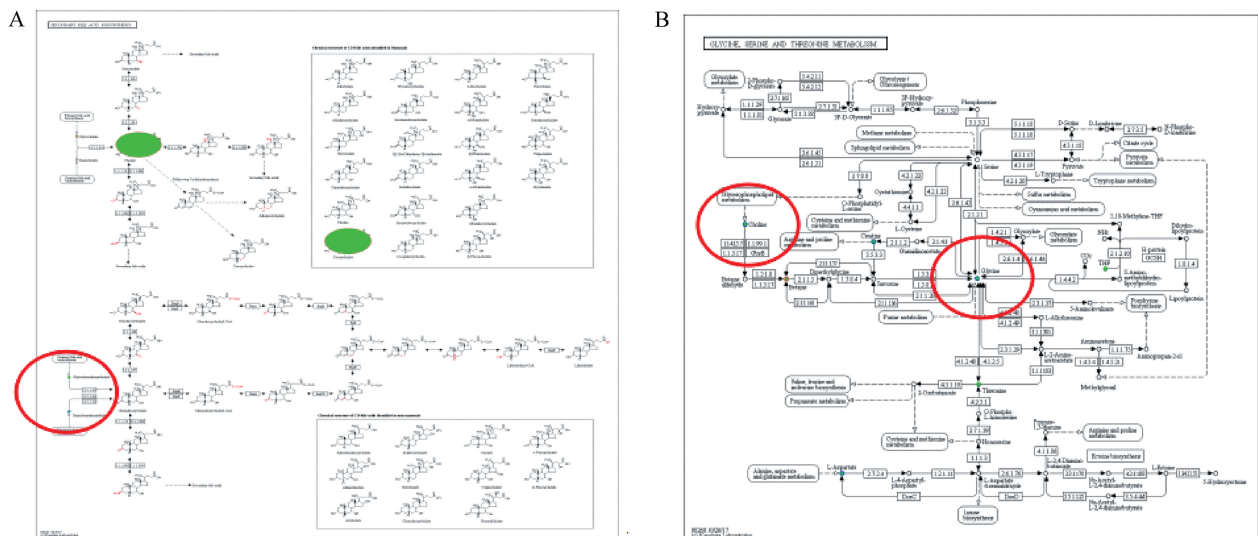


注:A:建模后6周;B:建模后10周。

图4 不同时间节点的共同差异代谢通路

Note. A, 6 weeks after modeling. B, 10 weeks after modeling.

Figure 4 Common differential metabolic pathways at different time nodes



注:A:胆汁酸代谢通路;B:甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路。

图5 冠心病病人源菌群小鼠差异代谢通路

Note. A, Bile acid metabolism pathway. B, Glycine, serine and threonine metabolism pathway.

Figure 5 Differential metabolic pathways in mice with coronary heart disease

控宿主代谢^[19]。胆汁酸的肠道调控,主要是通过激活肠道 FXR 核受体实现。胆汁酸代谢通路下调使胆固醇代谢减慢,血脂升高^[20]。这与模型组移植志愿者的临床症状、小鼠模型体重增长趋势及血脂变化情况相符。

本研究应用代谢组学技术对冠心病病人源菌群小鼠的特征性代谢产物及相关代谢通路进行研究分析,发现了与冠心病患者类似的改变,为冠心病病理机制、早期诊断、治疗效果评估等的研究提供了基础数据。但代谢组学技术可检测出大量差异

性代谢产物,如何有效筛选出与疾病明确相关的特征性代谢物质仍是需要解决的问题。这些不足希望可以通过进一步提高完善代谢组学检测分析技术来解决。

参 考 文 献(References)

- [1] Schnackenberg LK, Beger RD. Monitoring the health to disease continuum with global meta-bolic profiling and system biology [J]. *Pharmacogenomics*, 2006, 7(7): 1077.
- [2] Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, et al. Metabolomics as a tool for cardiac research [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8 (11) : 630-643.
- [3] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and S-everity of coronary heart diseases using IH NMR-based metabolomics [J]. *Nat Med*, 2002, 8 (12) : 1439-1444.
- [4] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Methbolic identification of novel Biomarker of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2005, 112(25): 3868-3875.
- [5] Calderon-Santiago M, Priego-Capo F, Galache-Osuna JG, et al. Analysis of Serum phospho-lipid profiles by liquid chromatography-tandem mass Spectrometry in high resolution mode for evaluation of atherosclerotic patients [J]. *J Chromatogr*, 2014, 1371: 154-162.
- [6] Ganna A, Salihovic S, Sundstrom J, et al. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10 (12) : e004801.
- [7] Lv M, Sun J, Wang M, et al. GC-MS based metabolomics study of stems and roots of *Ephe-dra sinica* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114: 49-52.
- [8] Ji P, Wei Y, Sun H, et al. Metabolomics research on the hepatoprotective effect of *Angelica sinensis* polysaccharides through gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromator*, 2014, 973: 45-54.
- [9] 朱华, 李卓, 秦川, 等. 冠心病人群菌群小鼠模型的建立及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 349-356.
Zhu H, Li Z, Qin C, et al. Establishment and evaluation of human flora associated animals related with coronary heart disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 349-356.
- [10] Ussher JR, Lopaschuk GD. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemi-c heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79: 259-268.
- [11] Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid Uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104: 203-210.
- [12] Tabatabaie L, Klomp LW, Berger R, et al. L-serine synthesis in the central nerous system; a review on serine deficiency disorders [J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 99: 256-267.
- [13] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meal, promotes atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 576-585.
- [14] Blair HC, Sepulveda J, Papachristou DJ. Nurture in atherosclerosis: the roles of acylcarnitin-e and cell membrane-fatty acid intermediates [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 78: 17-23.
- [15] Bergman BC, Tevetkovat, Lowes B, et al. Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans [J]. *J Physiol*, 2009, 587(Pt 9): 2087-2099.
- [16] Suzukim M, Suauki M, Kitamuray Y, et al. Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function impr-oving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 89 (1) : 36-43.
- [17] Qiu Q, Li C, Wang Y, et al. Plasma metabolomics study on Chinese medicine syndrome ev-olution of heart failure rats caused by LAD ligation [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14 (1) : 232-245.
- [18] Tailor L, Jame YC. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy [J]. *Pharmacol Reviews*, 2014, 66 (4) : 948-983.
- [19] Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, et al. Bile acids as regulatory molecules [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50 (8) : 1509-1516.
- [20] Zhang Y, Lacerte C, Kansra S, et al. Comparative potency of obeticholic acid and natural bi-le acids on FXR in hepatic and intestinal in vitro cell models [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2017, 5 (6) : 687-693.

[收稿日期] 2019-12-11