

基于 GC-MS 代谢组学研究抑郁大鼠血浆代谢物变化规律

王 翠¹, 贾雪洋¹, 侯璐文¹, 秦雪梅^{1,2}, 李建国^{1,2,3*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学生物学与分子工程教育部重点实验室,
3. 生物医学研究院, 山西 太原 030006)

摘要: 比较静态和动态代谢组学分析抑郁大鼠血浆差异代谢物结果, 为优化使用代谢组学数据分析方法研究复杂疾病病理提供参考。复制慢性温和不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 大鼠模型, GC-MS 代谢组学方法检测血浆代谢物, 分别使用 S-Plot 和方差同步主成分分析静态 (CUMS 模型复制终点) 和动态 (CUMS 模型复制全过程) 代谢组数据。结果显示, 静态代谢组学分析发现丙酸、D-阿洛糖和亚麻酸 3 个差异代谢物; 动态代谢组学分析获得丙酸、D-阿洛糖、肌醇、丁酸等 7 个差异代谢物。动态代谢组学分析发现的差异代谢物数量更多, 且丰度变化与大鼠行为学指标变化趋势相符程度更高。因此, 联合应用静态和动态代谢组学可为更准确理解抑郁症等复杂病理疾病提供支持。

关键词: GC-MS; 代谢组学; 慢性温和不可预知应激; S-Plot; 方差同步主成分分析; 抑郁

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0980-07

Analysis on dynamic variations of plasma metabolites of CUMS-induced depression rats by GC-MS metabolomics

WANG Cui¹, JIA Xue-yang¹, HOU Lu-wen¹, QIN Xue-mei^{1,2}, LI Jian-guo^{1,2,3*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, 3. Institutes of Biomedical Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: To compare static and dynamic metabolomics data analysis of CUMS (chronic unpredictable mild stress)-induced depression, GC-MS spectrometry was conducted on the plasma metabolome. S-Plot and ANOVA (analysis of variance)-simultaneous component analysis (ASCA) were respectively applied to static and dynamic analysis of metabolomics data. Static metabolomics data analysis revealed three typical plasma metabolites including propionic acid, D-allose, and 9,12,15-octadecatrienoic acid, while dynamic metabolomics data analysis found seven typical metabolites including propionic acid, D-allose, My-inositol, methylamine, etc. The abundances of typical metabolites observed by dynamic metabolomics data analysis were consistent with the variation trends of body weight and sugar water preference rate of CUMS rats. In conclusion, dynamic metabolomics analysis revealed more typical plasma metabolites, which have the potential to explain variations of body weight and behavior parameter of CUMS-induced depression rats. Combination of static and dynamic metabolomics data analysis may provide a strong support to the pathological study of complex diseases.

Key words: GC-MS; metabolomics; chronic unpredictable mild stress; S-Plot; analysis of variance-simultaneous component analysis; depression

收稿日期: 2018-01-06; 修回日期: 2018-02-17.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31570346); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D3113013).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018958, E-mail: lijg@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0025

代谢组学从整体角度测定机体对病理生理条件变化所产生的代谢应答, 从代谢物层面反映生物学事件, 研究生命活动规律, 因而成为病理生理、药理毒理等的重要研究手段^[1]。核磁共振 (NMR)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 和气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 是代谢组学研究的主要技术^[2]。与 NMR 相比, 质谱技术具有较高的灵敏度和分辨率, 其中 GC-MS 因具有较为成熟的代谢物标准图库, 方便对代谢组分的定性鉴别, 且检测谱可覆盖更多低极性成分, 在代谢组学研究中应用广泛^[3, 4]。

应用代谢组学手段研究抑郁症病理和药物抗抑郁药理, 加深了对抑郁症的认识^[5-7]。对双相抑郁患者尸检脑组织样品的代谢组学研究显示^[5], 谷氨酸盐、*N*-乙酰天冬氨酸等代谢物丰度与健康对照显著不同, 且随药物治疗相应回调; 对抑郁症患者粪便代谢组学研究^[6], 发现了“脂质、氨基酸代谢紊乱”和“小分子生物化学紊乱”, 为提高对抑郁症病理生理特征的认识, 深入研究抑郁症发病机制和开发生物标志物提供了重要参考^[5-7]。

代谢组学数据分析运用多元统计 (PCA、PLS-DA 等) 手段从海量代谢物获得差异信息, 不仅可以对病理生理状态进行有效分类, 还可给出病理生理指标相关的特征性代谢物, 与形态学、行为学和有限生化指标检测等方法相比具有较高灵敏性和广谱性^[1]。但传统静态代谢组学研究复杂疾病病理仅从横断面数据入手研究, 未充分考虑疾病病理过程的复杂性, 因而易得到相对片面的结论, 不能全面反映生理病理演变规律^[8, 9]。

动态代谢组学将生理病理动态演变过程纳入分析范畴, 区分随时间演变的群体差异和不随时间变化的个体差异, 更准确全面反映生理病理特点^[9, 10]。其中方差同步主成分分析 [ANOVA (analysis of variance)-simultaneous component analysis, ASCA] 充分考虑生理病理过程, 按时间因素、表型因素、时间因素和表型因素的交互效应三方面将代谢组学数据分解为效应矩阵, 分别对此三组矩阵进行 PCA 分析, 得到各效应方面随时间改变的得分变化趋势, 从而对生理病理过程给出更为准确的生物学解释, 已成功应用于药物毒理^[8]和营养干预^[9]等研究。

基于上述 GC-MS 代谢组学的优势, 和静态代谢组学数据分析的不足, 本研究应用 GC-MS 测定大鼠 CUMS 造模过程血浆代谢组数据, 联合应用静态和动态代谢组数据分析手段, 分析抑郁大鼠血浆代谢物变化规律, 为深入了解抑郁症病理提供参考。

材料与方法

实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (200±20 g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2014-0001。昼夜节律光照下饲养, 环境适应一周后开始实验。

试剂与仪器 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷) 三氟乙酰胺 (MSTFA)、1% 三甲基氯硅烷、甲氧胺盐酸盐 (methoxyamine hydrochloride) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 色谱纯乙腈、甲醇购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。丙酸、丁酸、*D*-阿洛糖、肌醇、亚麻酸 (9,12,15-octadecatrienoic acid) 购自中国食品药品检定研究院。

Trace GC-PolarisQ Mass 气相色谱-质谱联用仪 (美国 Thermo-Fisher); 5810R 台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf); 代谢笼 (苏州实验动物); YSD-4 药理生理实验多用仪 (北京和同创业)。

CUMS 大鼠模型复制 按照 Li 等^[11]的方法复制 CUMS 抑郁大鼠模型。SD 大鼠在室温 (24±1) °C、湿度 (60±5) % 及昼夜节律光照环境适应 7 天后, 随机分为对照组和模型组各 8 只。对照组 SD 大鼠群养, 不给予刺激; 模型组大鼠给予总计 10 种实验刺激, 持续 28 天, 为保证刺激因素的随机不可预知性, 各种刺激方式随机排列, 且每种刺激不连续出现, 出现总次数不超过 4 次。

行为学测试与样品采集 CUMS 模型复制过程第 0、7、14、21 和 28 天分别进行体重和糖水偏爱率测定。为降低误差, 固定在测量日 9 时测量体重。糖水偏爱率测试按以下方案: 给实验大鼠提供双瓶水, 一瓶为普通饮用水, 另一瓶为含 1% 蔗糖的饮用水。测试前整晚禁食禁水, 后同时给予上述双瓶水, 自由饮水 1 h 后称取水瓶重量计算消耗量。按以下公式计算: 糖水偏爱率 (%) = 糖水摄入量 (g) / 总饮水摄入量 (g) × 100%。所有实验大鼠于造模过程第 0、7、14、21 和 28 天眼眶毛细管取血, 置于 EDTA 抗凝管。收集的血液样品常温静置 30 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清, 转移至 1 mL 洁净 EP 管, 置 -80 °C 保存。

GC-MS 分析测试

样品制备 将冻存的血浆样品于冰水混合物中解冻后, 取 200 μL 加入乙腈 400 μL, 充分振荡均匀, 4 °C, 13 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液 400 μL, 30 °C 下真空干燥 12 h。加入甲氧胺吡啶溶液 (15 mg·mL⁻¹) 30 μL, 70 °C 下作用 1 h, 反应结束后加入 MSTFA 50 μL, 40 °C 作用 90 min 进行衍生化反应,

加入内标二十四烷-正庚烷 100 μL , 混匀待测。

色谱质谱条件 DB-5MS 色谱柱 (5% 二苯基-95% 二甲基聚硅氧烷, 30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$, Agilent J&W Scientific, Folsom, 美国); 进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$; 1/10 进样分流比分流进样; EI 离子源温度和传输线温度分别为 200 $^{\circ}\text{C}$ 和 280 $^{\circ}\text{C}$; 电子能量为 70 eV; 质谱扫描采用全扫描模式, 扫描范围 m/z 50~650。程序升温条件为: 起始 80 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min; 以 7 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度升温至 140 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min; 以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度升温至 180 $^{\circ}\text{C}$, 保持 6 min, 再以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度升温至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min。

GC-MS 图谱处理 首先在 Xcalibur 工作站中将图谱由 raw 格式转化为 NetCDF 格式。使用 R 软件导入 XCMS 数据包进行滤噪、谱峰对齐及提取等操作, 将生成的 csv 文件导入 Excel 中, 以每个样品总峰面积分别进行归一化。

静态多元统计分析 将 CUMS 模型复制第 28 天代谢组数据归一化后导入 SIMCA-P 14.0 (Umetrics, Sweden) 软件, 经帕莱托标度化后进行 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析。利用载荷图 S-Plot 确定组间差异变量, 采用 SPSS 22.0 进行独立样本 t 检验, 以变量在项目中的重要性 (VIP 值 > 1) 以及 t 检验显著性 ($P < 0.05$) 确定差异代谢物。

方差同步主成分分析 (ANOVA-simultaneous component analysis, ASCA) 将 CUMS 造模过程中 5 个时间点 (0、7、14、21 和 28 天) 代谢组数据归一

化后载入 MetaboAnalyst 网站 (metaboanalyst.ca) 在线分析^[12], 数据使用常和标准化 (constant sum)、对数变换 (log transformation) 和帕莱托标度化。使用 Leverage 评价代谢物对模型的贡献, SPE 评价模型对特定代谢物的适配程度。具有低 SPE 值和高 Leverage 值的代谢物对模型贡献值较大, 作为 ASCA 分析差异代谢物。

结果

1 CUMS 模型复制成功

为检验 CUMS 模型复制效果, 分别测定模型组和对照组各时间点的体重和糖水偏爱率, 结果如图 1a 和 1b 所示。模型组体重在第 21 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在第 28 天时极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。模型组糖水偏爱率在第 28 天时极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。为进一步评价 CUMS 模型复制效果, 在造模第 28 天对大鼠进行了旷场实验, 结果如图 1c~1f 所示。模型组在静止时间、理毛时间、直立次数、穿越格数等旷场实验指标方面与对照组相比均发生显著变化。上述结果提示, 第 28 天时 CUMS 模型复制成功。

2 代谢物指认

使用实验大鼠血浆 GC-MS 总离子流色谱图, 通过 NIST 05 质谱库检索、对照品比对、文献参考、HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>) 比对等方法共指认出 34 种内源性代谢产物, 其中包括氨基酸、糖

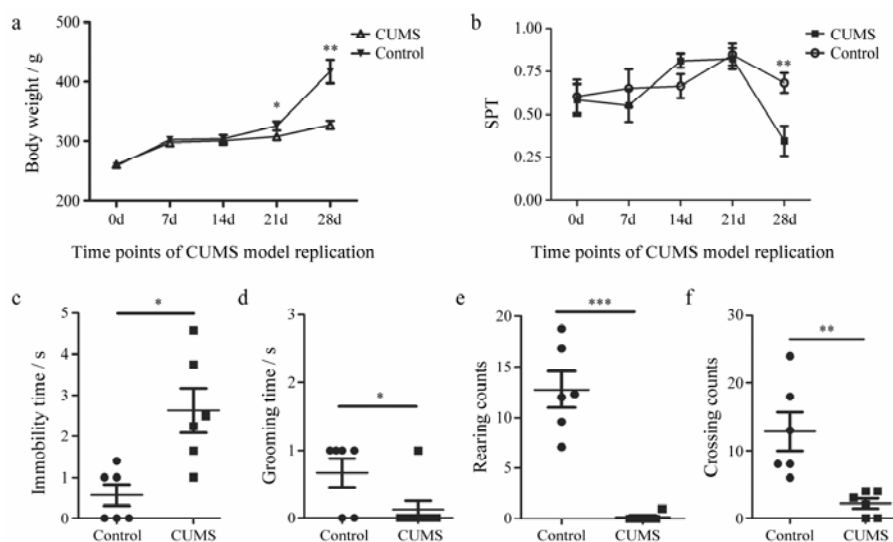


Figure 1 Dynamic variations of body weight (a) and sugar preference rate (b) of rats under CUMS (chronic unpredictable mild stress) model replication, and abundance of plasma neurotransmitters (c-f) and open-field test results at the 28 d of CUMS model replication. Body weight was weighed at 9 a.m. of each time point. SPT represents sugar water preference rate, calculated with formula: $\text{SPT} = \text{sucrose consumption} / (\text{sucrose consumption} + \text{water consumption})$. Open field tests were performed on the 28th day of CUMS model replication

类、脂肪酸等, 结果见表 1。

3 静态代谢组学分析

3.1 主成分分析 使用 PCA 方法对 CUMS 复制过程所有时间点的血浆 GC-MS 结果进行分析, 结果如图 2a 所示。血浆主成分在 CUMS 模型复制的第 0 天和第 7 天未见明显差异, 而在第 14 天产生了较大范围波动, 到第 21 天时整体与第 0 天明显分开, 第 28 天继续保持这种分开趋势。结果提示, 大鼠 CUMS 模型复制第 14 天时对外界持续刺激产生剧烈反应, 第 21 天时整体代谢轮廓与模型复制起点相比已发生显著变化。

3.2 差异代谢物分析 为寻找与 CUMS 模型复制相关的血浆代谢物, 对模型组与对照组进行 OPLS-DA 分析, 并作代谢物载荷图 (图 2b、2c)。由图 2b 可见, 对照组和模型组可以明显分离, 说明两组血浆代谢物发生明显改变。按照代谢物载荷图 (图 2c) 中距原点越远对分组差异贡献 (VIP) 越大原则, 筛选得到

VIP>1 的代谢物, 结合代谢物峰面积的独立样本 *t* 检验, 确定峰面积具有显著差异的血浆代谢物 (表 2)。

Table 2 Typical plasma metabolites of rats with successful model replication of CUMS. *VIP: Variable importance for the projection. Metabolites with VIP >1 in the OPLS-DA model and *P* < 0.05 in the independent samples *t*-test were considered to be typical metabolites contributing to the separation of the study groups

Retention time/min	Metabolite	VIP*	<i>P</i>
11.68	9,12,15-Octadecadienoic acid	8.54	0.015
11.72	Propionic acid	8.65	0.016
38.44	<i>D</i> -Allose	6.71	0.033

4 ASCA 动态代谢组学分析

为深入考察 CUMS 模型复制过程中代谢物的动态变化, 使用 ASCA 动态代谢组学手段对各时间点的血浆 GC-MS 数据进行分析, 结果如图 3 所示。按照 Leverage 值越高且 SPE 值越低的代谢物对模型贡献

Table 1 Plasma metabolites of rats based on GC-MS detection

<i>t_R</i> /min	Metabolite	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	Metabolite	<i>m/z</i>
7.50	Methylamine	73, 86, 160	20.92	Threonine	73, 117, 218, 219
8.82	3-Hydroxybutyric acid	73, 117, 147, 191	24.23	Succinic acid	73, 147, 233
9.80	Acetamide	73, 77, 134	25.34	Proline	73, 156
11.68	9,12,15-Octadecadienoic acid	41, 55, 73, 133	26.83	Glutaric acid	73, 75, 147
11.72	Propionic acid	73, 117, 147	28.18	Glutamic acid	73, 246
11.77	Lactic acid	73, 117, 147	28.49	Phenylalanine	73, 192, 218
12.78	Bis-sarcosine	73, 116, 147	31.58	Aminomalonic acid	73, 75, 147, 214
13.69	Oxalic acid	73, 147	37.19	1,5-Dehydrated- <i>D</i> - sorbitol	73, 147, 191, 217
14.03	Butyric acid	73, 117, 147	38.01	<i>D</i> -Psicose	73, 103, 147, 217
14.50	1-Monoleoyl glycerol	73, 147, 207	38.09	<i>D</i> -Galactose	73, 147, 205, 319
14.61	Isoleucine	86	38.44	<i>D</i> -Allose	73, 147, 205, 319
15.39	Valine	73, 144	39.34	2-Piperidine carboxylic acid	73, 156
16.21	Urea	73, 147, 189	39.82	Tyrosine	73, 218
16.60	Serine	73, 116, 132	42.64	Hexadecanoic acid	73, 117, 313
17.79	Threonine	73, 117, 130	43.40	Myo-inositol	73, 147, 217, 305
18.25	Glycine	73, 174, 248	46.87	Stearic acid	73, 117, 341
19.39	2,3-Dihydroxyl butyric acid	73, 117, 147, 292	49.96	Ethane	73, 290

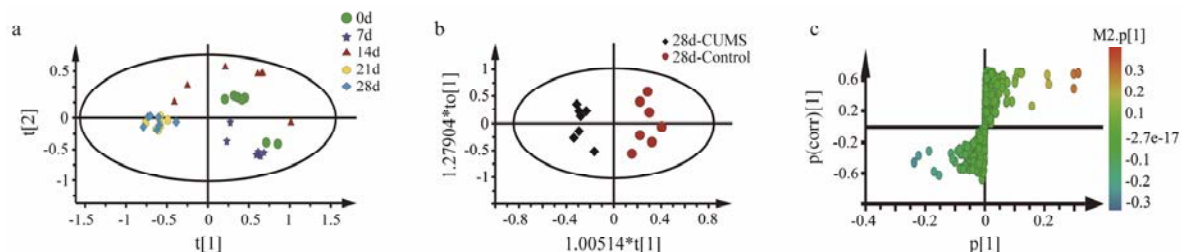


Figure 2 PCA scatter plot of plasma metabolites of rats under CUMS model replication (a), and OPLS-DA scores plot (b) and S-plot (c) of rats at the 28th day of CUMS model replication. PCA scatter plot is consisted of total plasma metabolites from 5 time points (0, 7, 14, 21, and 28 d) of CUMS model replication. OPLS-DA and S-Plot were constructed based on the total plasma metabolites of CUMS and Control groups on the 28th day of CUMS model replication

值越大的原则，获得随时间、表型及二者交互作用显著变化的代谢物 (表 3)。其中 *D*-阿洛糖、肌醇和 1,5-脱水-*D*-山梨醇是随 CUMS 模型复制时间显著变化的代谢物；丙酸、丁酸和 *D*-阿洛糖是与 CUMS 表型相关的差异代谢物；甲胺、乙烷、丙酸、丁酸和 *D*-阿洛糖是与时间和表型交互作用显著相关的代谢物。

5 血浆差异代谢物动态变化

为进一步确证本研究静态和动态代谢组学分析获得的大鼠抑郁相关血浆代谢物 (表 2、3)，对各代谢物在 CUMS 模型复制过程中的动态变化进行分析，结果如图 4 所示。静态和动态代谢组学共同发现的差异代谢物丙酸，在 CUMS 模型复制第 28 天时，与第 0 天相比显著降低 (*t* 检验, $P < 0.01$)，这与大鼠体重和糖水偏爱率及旷场实验指标变化趋势相符 (图 1a 和 1b)；共同发现的差异代谢物 *D*-阿洛糖在 CUMS 模

型复制第 14 和 28 天时，与 CUMS 模型复制起点相

Table 3 Typical plasma metabolites of rats under CUMS model replication inferred from ASCA analysis. #SPE: Special purpose entity. SPE was used to test the fitness of a model for the metabolite

Model	Metabolite	Leverage	SPE [#]
Time	<i>D</i> -Allose	3.85×10^{-3}	5.14
	Myo-inositol	3.66×10^{-3}	9.63
	1,5-Dehydrated- <i>D</i> -sorbitol	3.69×10^{-3}	7.51
Phenotype	Propionic acid	5.36×10^{-3}	1.23×10^{-30}
	Butyric acid	4.08×10^{-3}	3.08×10^{-31}
	<i>D</i> -Allose	7.87×10^{-3}	1.23×10^{-30}
Interaction	Methylamine	7.86×10^{-3}	7.90×10^{-1}
	Ethane	8.98×10^{-3}	3.55
	Propionic acid	7.94×10^{-3}	1.28
	Butyric acid	2.38×10^{-2}	4.28
	<i>D</i> -Allose	7.24×10^{-3}	3.27

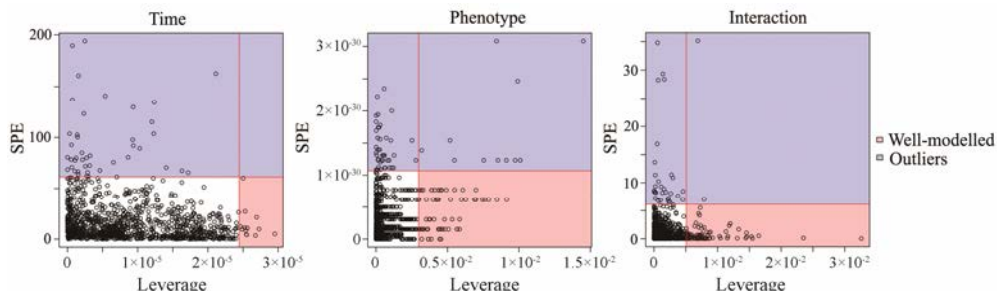


Figure 3 Leverage/SPE scatter plots of the ASCA variables submodels. The metabolomics dataset from all five time points of CUMS model replication were introduced to MetaboAnalyst web portal (www.metaboanalyst.ca) to construct these scatter plots. ANOVA (analysis of variance)-simultaneous component analysis (ASCA) was applied to split the original dataset into subsets describing the variations of phenotypes, the variations of time, and their interactions. Leverage was employed to evaluate the importance of a metabolite to the model, and SPE (special purpose entity) was used to test the fitness of a model for the metabolite. Variables with high Leverage value and low SPE value were considered to have significant contributions to the model

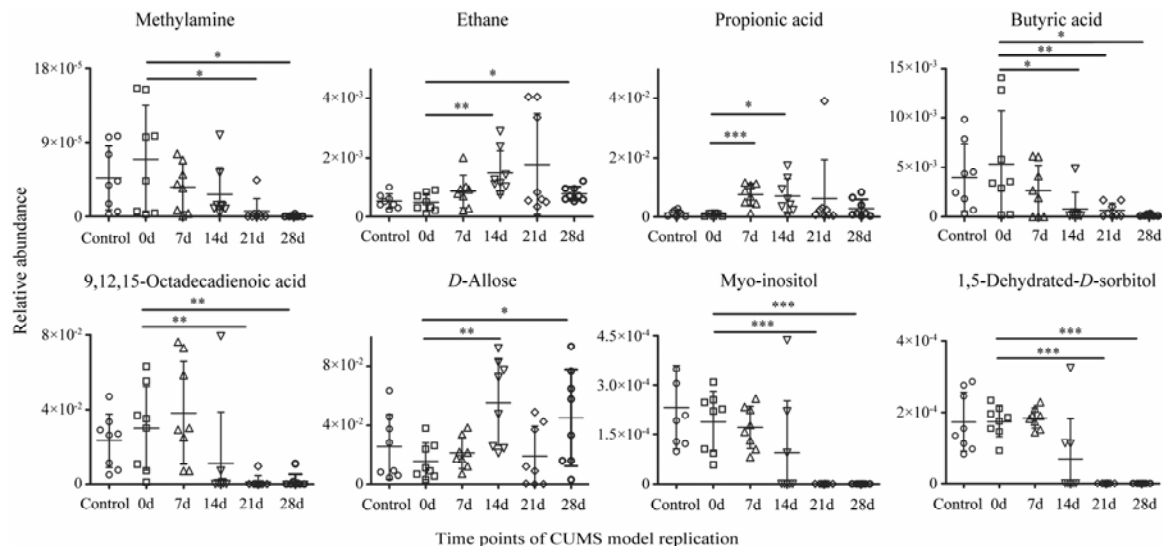


Figure 4 Dynamic variations of typical plasma metabolites of rats under CUMS replication. Relative abundances of typical metabolites were represented by their relative peak area. Student *t*-test was performed to infer the inter-group difference. Differences supported by statistic test with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ were shown

比显著升高。

动态代谢组学发现的差异代谢物丰度在 CUMS 模型复制的第 28 天时, 与第 0 天相比均发生显著变化; 且除乙烷外, 其他差异代谢物丰度在第 21 天时, 已经发生了上述显著变化, 这与大鼠体重变化趋势相符 (图 1a); 静态代谢组学发现的差异代谢物亚麻酸丰度仅在 CUMS 模型复制第 7 天和第 14 天时, 与第 0 天相比发生显著变化。上述结果说明, 动态代谢组学数据分析可发现更多血浆差异代谢物, 且差异代谢物的丰度变化与 CUMS 模型的行为学指标变化相符程度更高。

讨论

代谢组学近年来迅速发展成为疾病病理和药物药理毒理研究的重要方法, 为深入认识疾病病理发挥了重要作用^[13,14]。随着认识的不断深入, 人们发现复杂疾病病理发展是多重病理机制相互作用的过程, 并伴随机体代谢状态的不断变化^[15]。而基于横断面数据的传统代谢组学分析方法不能全面反映复杂疾病的病理发展过程, 包含时间因素的动态代谢组学数据有助于更全面准确反映机体代谢状态^[16,17]。传统静态代谢组学分析方法只是将原始数据的最大变异进行降维, 把与时间相关的变异作为混杂因素处理, 忽略了随时间变化因素对整体的重要作用^[18]。为更真实反映代谢组学数据的内部结构, 在数据降维的同时捕捉随时间趋势产生的变异, 人们研发了多种动态代谢组学数据分析方法^[9]。其中方差同步主成分分析可用于检验不同来源变异随时间的变化趋势, 已被成功应用于化学计量学^[19]、蛋白质组学^[20]、心理测量学^[21]等研究。

本研究通过比较静态代谢组和动态代谢组数据分析方法, 研究抑郁大鼠血浆代谢物变化规律。在两种方法均发现丙酸和 D-阿洛糖作为差异代谢物的同时, 动态代谢组学数据分析发现了更多血浆差异代谢物, 且差异代谢物丰度与抑郁指标变化趋势符合程度更高。本研究为联用动态和静态代谢组学数据分析方法、深入研究抑郁症病理提供了新思路。

References

[1] Weng R, Shen S, Tian Y, et al. Metabolomics approach reveals integrated metabolic network associated with serotonin deficiency [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11864.
 [2] Xia XT, Sun N, Liu CC, et al. Discovering potential biomarkers of depression and drug intervention of paroxetine

base on ¹H NMR metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 595-599.
 [3] Peng GJ, Shi BY, Tian JS, et al. ¹H NMR based metabolomics study on the anti-depressant effect of genipin in rat hippocampus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 209-216.
 [4] Tian JS, Liu CC, Xiang H, et al. Investigation on the antidepressant effect of sea buckthorn seed oil through the GC-MS-based metabolomics approach coupled with multivariate analysis [J]. *Food Function*, 2015, 6: 3585-3592.
 [5] Lan M, Mcloughlin G, Griffin J, et al. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder [J]. *Mol Psychiatry*, 2009, 14: 269-279.
 [6] Wu D. Metabonomics Based Research on Fecal of Depressed Patients (基于代谢组学的抑郁患者粪便研究) [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2016.
 [7] Huang T, Lin C. Advances in biomarkers of major depressive disorder [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 68: 177-204.
 [8] Dai D, Gao Y, Chen J, et al. Time-resolved metabolomics analysis of individual differences during the early stage of lipopolysaccharide-treated rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34136.
 [9] Wang WJ, Zhang QJ, Qu SY, et al. Introduction to data analysis method of dynamic metabolomics [J]. *Chin J Health Stat (中国卫生统计)*, 2016, 33: 1075-1078.
 [10] Velzen E, Westerhuis J, Duynhoven J, et al. Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7: 4483-4491.
 [11] Li Z, Zheng X, Gao X, et al. Study of plasma metabolic profiling and biomarkers of chronic unpredictable mild stress rats based on gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 3539-3546.
 [12] Xia J, Wishart D. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis [J]. *Curr Protoc Bioinform*, 2016, 55: 14.10.1-14.10.91.
 [13] Clish C. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine [J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2015, 1: a000588.
 [14] Hoffman J, Lyu Y, Pletcher S, et al. Proteomics and metabolomics in ageing research: from biomarkers to systems biology [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61: 379-388.
 [15] Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e32737.
 [16] Montana G, Berk M, Ebbels T. Modelling short time series in metabolomics: a functional data analysis approach [J]. *Adv*

- Exp Med Biol, 2011, 696: 307–315.
- [17] Huang X, Zeng J, Zhou L, et al. A new strategy for analyzing time-series data using dynamic networks: identifying prospective biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32448.
- [18] Smilde A, Westerhuis J, Hoefsloot H, et al. Dynamic metabolomic data analysis: a tutorial review [J]. *Metabolomics*, 2010, 6: 3–17.
- [19] de Noord O, Theobald E. Multilevel component analysis and multilevel PLS of chemical process data [J]. *J Chemom*, 2005, 19: 301–307.
- [20] Harrington P, Vieira N, Espinoza J, et al. Analysis of variance-principal component analysis: a soft tool for proteomic discovery [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 544: 118–127.
- [21] Timmerman M, Kiers H. Four simultaneous component models for the analysis of multivariate time series from more than one subject to model intra-individual and inter-individual differences [J]. *Psychometrika*, 2003, 68: 105–121.