

基于¹H NMR 尿液代谢组学的黄芩不同生长部位抗衰老作用研究

李萌茹¹, 周玉枝^{1*}, 柴建新², 陈强², 高丽¹, 杜冠华^{1,3}, 秦雪梅¹

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西振东制药股份有限公司, 山西长治 047100;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 本文利用¹H NMR代谢组学技术, 考察黄芩不同生长部位(根、茎、叶、花)醇提物对D-半乳糖(D-galactose, D-gal)诱导的衰老模型大鼠尿液中内源性物质代谢的影响, 为后期的抗衰老机制研究提供依据。研究结果显示, 从空白组收集的尿液核磁谱图中指认出32种内源性代谢物。对所有组的谱图进行多元统计分析, 结合VIP值和t检验找到14种差异代谢物, 其中与空白组相比, 模型组的大鼠尿液中 α -酮戊二酸、马尿酸和3-羟基丁酸含量明显降低($P<0.05$), 氧化三甲胺、甘氨酸、丙氨酸、乳酸、二甲基甘氨酸、醋酸盐、丙酮酸、牛磺酸、尿囊素、甜菜碱和N-乙酰化糖蛋白含量明显升高。这些代谢物主要涉及牛磺酸和亚牛磺酸代谢; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 丙酮酸代谢; 糖酵解/糖异生; 乙醛酸和二羧酸代谢; 三羧酸循环等。黄芩根、茎、叶、花醇提物能够对衰老大鼠尿液样本中的差异代谢物的含量进行不同程度的调节, 对衰老大鼠的代谢紊乱起到一定的改善作用。相较于黄芩根、茎、花醇提物, 黄芩叶可以调节更多的代谢物, 主要涉及牛磺酸和亚牛磺酸代谢; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 丙酮酸代谢等。本研究为今后黄芩地上部分的资源开发提供可靠的实验依据。本实验获得山西大学伦理委员会批准(批准号: SXULL2016036)。

关键词: 尿液; 代谢组学; 黄芩; 衰老; 不同生长部位; 叶

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)11-2702-11

The anti-aging effects of different parts of *Scutellaria baicalensis* Georgi based on ¹H NMR urine metabolomics

LI Meng-ru¹, ZHOU Yu-zhi^{1*}, CHAI Jian-xin², CHEN Qiang², GAO Li¹, DU Guan-hua^{1,3}, QIN Xue-mei¹

(1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Shanxi Zhen Dong Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 047100, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The effects of alcohol extracts from roots, stems, leaves, and flowers of *Scutellaria Baicalensis* Georgi (SBG) on endogenous metabolism in D-gal-induced aging-model rats were investigated by ¹H NMR metabolomics. Results showed that 32 endogenous metabolites were identified in the urine. Combined with the VIP value and t-test, 14 different metabolites were found by multivariate statistical analysis of the spectrum. Compared with the control group, the content of α -ketoglutaric acid, hippuric acid and 3-hydroxybutyrate in the urine of rats in the model group was significantly decreased ($P<0.05$) and the content of trimethylamine oxide, glycine, alanine, lactic acid, dimethylglycine, acetate, pyruvate, taurine, allantoin, betaine, N-acetylated glycoprotein was significantly increased ($P<0.05$). The metabolites were mainly derived from taurine and hypo-aurine metabolism; glycine,

收稿日期: 2020-05-28; 修回日期: 2020-07-22.

基金项目: 山西省重点研发计划重点项目(201603D3114015); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室资助项目(201605D111004); 山西省科技创新重点团队资助项目(201605D131045-18); 山西省重点研发计划项目(201703D321023-3); 山西省留学回国人员科技活动择优资助项目(201991).

*通讯作者 Tel: 86-351-7019178, E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0865

serine and threonine metabolism; pyruvate metabolism; glycolysis/gluconeogenesis; glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism; and the tricarboxylic acid cycle. The content of differential metabolites in urine samples was altered by the alcohol extracts from the different parts of SBG. Leaves extracts of SBG had the greatest effect on urine metabolites, and mainly affected taurine and hypo-taurine metabolism; glycine, serine and threonine metabolism; and pyruvate metabolism. This study provides a reliable experimental basis for the future development of SBG. This animal experiment was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Shanxi University (SXULL2016036).

Key words: urine; metabolomics; *Scutellaria baicalensis*; aging; different growth site; leaf

衰老是一种正常的现象,随着年龄的增长,机体内多个组织、器官功能发生退行性变化,对心脑血管疾病、神经退行性变等疾病的易感性增加,影响老年人群的生活质量^[1]。因此,深入研究并探索衰老机制,延缓衰老及衰老相关疾病的发生,安全有效地提高老年人的生活质量,具有重要的社会价值。

唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi, SBG) 的传统部分药用部位是其根部,含有多种黄酮类成分,具有抗菌、抗病毒、抗炎、清除自由基、抗氧化、神经保护等多种药理作用^[2]。本课题组前期致力于黄芩的化学成分研究及其主要成分在不同动物模型上的抗衰老作用研究,如SD大鼠^[3-5]、果蝇^[6,7]、快速老化小鼠 (senescence accelerated mouse prone 8, SAMP8)^[8,9]等,均发现黄芩中含有的化学成分具有延缓衰老的作用。随着黄芩资源的不断开发,黄芩的茎、叶、花也得到人们的关注。本课题组前期采用液质联用技术对黄芩根、茎、叶、花醇提物的化学成分进行比较分析^[2,10],研究发现不同部位的化学成分组成存在明显差异。此外,采用行为学实验、生化指标以及病理切片等进行黄芩不同生长部位的药效评价,并对衰老大鼠的血清和肝脏进行代谢组学研究^[10-13],表明黄芩根、茎、叶、花醇提物均具有延缓衰老的作用。因此,从资源的综合利用及可持续发展出发,开展黄芩根、茎、叶、花的抗衰老作用及机制的对比研究,进一步挖掘黄芩地上部分的潜在药理活性具有重要的现实意义。

作为系统生物学的最下游,代谢组学能整体分析生物体内因病理、生理或基因改变等刺激所致内源性代谢物的动态变化和受影响的代谢通路^[14],研究药物或某些刺激因素的作用机制^[5],适合中医药复杂体系的分析^[4]。由于衰老发展过程的复杂性,目前对于衰老的发生机制尚未完全清楚。近年来,代谢组学技术的应用,有助于全面理解病理变化过程及机体内物质的代谢途径,为衰老的病理生理学提供了新的解释,并且可以在不同物种中鉴定与衰老相关的特异标记物。目前,基于代谢组学方法分析D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的衰老大鼠血清和肝脏样本,研究发现黄

芩根、茎、叶、花醇提物给药后调节的衰老生物标志物主要涉及氨基酸代谢和能量代谢^[10-13]。但对尿液中的生物标志物还未见深入研究。尿液作为一种重要且易获取的流体,其组成及其代谢物的浓度会受到机体各系统功能状态的直接影响,能反映机体的代谢状况。

因此,本文将基于¹H NMR 尿液代谢组学技术,结合多元统计分析,来探讨D-半乳糖致衰老大鼠的尿液代谢异常以及黄芩根、茎、叶、花醇提物对机体代谢的调节作用,为今后黄芩资源的进一步开发提供可靠的实验依据。

材料和方法

仪器与试剂 D-半乳糖 (Sigma-Aldrich LLC.); 无水乙醇 (分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司); 重水 (Norell, Landisville, 美国); 三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA); RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Morris 水迷宫视频分析系统 (150 cm×60 cm×30 cm); TGL-16 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); BSA124S 分析天平 (Sartorius, 德国); Bruker 600-MHz Avance III 核磁共振仪 (Bruker, 德国)。

药材 黄芩不同生长部位的样本均购自山西佳辰中药材开发有限公司,经山西大学秦雪梅教授鉴定为黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根、茎、叶、花,并保存于山西大学中药现代研究中心。

黄芩根、茎、叶、花醇提物的制备 Chang 等^[15,16]对黄芩提取方法进行考察,研究发现,选择60%乙醇为提取溶剂时,黄芩醇提物中的主要有效成分黄芩苷的含量高于黄芩水提物。故本实验取黄芩根、茎、叶、花样本适量,加60%乙醇 (1:10, w/v),加热回流提取2次,每次2 h,合并提取液,过滤取上清。经旋转蒸发器浓缩、真空冷冻干燥,得到冻干粉,称量所得粉末质量,计算产率,并于4℃冰箱低温保存备用。经过计算得黄芩根、茎、叶、花醇提物的产率分别为49.9%、11.5%、32.6%、25.7%^[10,13]。

动物与分组 雄性 SPF 级 SD 大鼠 (160 ± 20 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK-2016-0011。实验期间饲养环境为恒温 (22 ± 3 °C)、恒湿 (40%~70%)、12 h 光暗循环, 实验过程中自由饮食、饮水。适应环境一周后, 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 包括空白组 (control, C)、模型组 (model, M)、黄芩根组 (roots, R)、黄芩茎组 (stems, S)、黄芩叶组 (leaves, L)、黄芩花组 (flowers, F), 每组 10 只。模型组的大鼠连续 7 周每日腹腔注射 *D*-gal 300 mg·kg⁻¹, 复制衰老模型, 空白组注射等体积的生理盐水。各给药组的大鼠在造模给药的同时, 分别每日灌胃给予相应的黄芩根、茎、叶、花醇提物 (生药量 400 mg·kg⁻¹), 持续 7 周, 空白组和模型组的大鼠灌胃等体积的蒸馏水。在实验过程中每 3 天记录 1 次大鼠的体重增长等外在表征变化。本实验符合动物实验伦理学标准, 并获得山西大学伦理委员会批准 (批准号: SXULL2016036)。

行为学实验 在造模第 7 周进行 Morris 水迷宫实验, 包括定位航行和空间探索实验, 综合用于考察大鼠的空间学习记忆能力。该实验要求周围环境安静, 避免一切外界干扰, 实验过程中周围的参照物要始终保持不变。

定位航行实验: 每天训练 2 次, 重复实验 4 天, 以帮助大鼠回忆平台位置。实验时, 随机选取任意一个象限将大鼠面向池壁放入水中, 迫使大鼠寻找设于水面以下的平台。搜索平台上限时间为 60 s, 爬上平台后, 让大鼠休息持续 20 s。若大鼠在 60 s 内未找到该平台, 则将其引导至平台适应 20 s。记录各组大鼠找到隐藏平台的时间, 即为潜伏期。

空间探索实验: 实验第 5 天, 将平台从水中撤离, 将每只大鼠放入到与平台象限正好相对的区域的水中。记录大鼠的潜伏期, 穿越平台次数以及 60 s 内在目标象限的停留时间^[3,15]。

样本采集与制备及测定条件

样本采集 解剖前一天晚上 18:00 前将所有大鼠放入代谢笼, 禁食, 冰上收集晚上 18:00 至第二天早上 8:00 的尿液。收集的尿液样本在 13 000 r·min⁻¹、4 °C 条件下离心 15 min, 取上清液, 分装后储存于 -80 °C 冰箱中。

尿液的备样方法 取尿液样本在冰水中解冻、摇匀, 精确吸取尿液 500 μL 至 EP 管中, 加入 D₂O 配制的磷酸缓冲液 [0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄-0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, (81:19) 200 μL, pH 7.40, 含 0.1% TSP], 重水用于锁场, 涡旋 30 s 混匀。13 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 20 min, 取上清液 600 μL 转移至 5 mm 核磁管中待测。

NMR 测试条件 样品于 600 MHz NMR 仪上进行

测定 (25 °C), 采用 NOSEYS (noesyppr1d) 脉冲序列, 内标为 TSP。测定参数为 600.13 MHz, 扫描次数为 64, 脉冲时间为 14 μs, 谱宽 12 345.7 Hz, 延迟时间为 1.0 s, 采样数据点 65 536, 采样时间点为 2.654 s, FID 分辨率为 0.188 Hz。

¹H NMR 尿液代谢谱图预处理与多元统计分析 使用 MestReNova 12 (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 进行 ¹H NMR 图谱相位和基线校正, 并参考 TSP (δ 0.00) 进行定标。以 δ 0.01 对所有图谱 δ 0.50~9.50 区域分段积分, 其中去除 δ 4.60~5.10 和 δ 5.50~6.20 区域以消除残留水峰和尿素峰的影响, 将总峰面积归一化后的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.0 (Umetrics, Sweden)。

首先采用有监督模式的偏最小二乘法判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 方法对每组样本进行代谢轮廓分析; 其次对空白组和 *D*-gal 诱导的模型组进行外部模型验证; 然后采用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal projection to latent structure discriminate analysis, OPLS-DA) 进行模型组和空白组间比较, OPLS-DA 模型质量评估采用 CV-ANOVA 测试 (*P*<0.05), 并应用 S-plot、VIP 值 (>1) 结合参数检验法 (*t* 检验) 用以寻找差异代谢物; 最后将所得差异代谢物的信息导入 Metabo-Analyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/faces/ModuleView.xhtml>) 的代谢通路分析模块, 该模块将通路富集分析与通路拓扑分析相结合, 以筛选与衰老相关的关键代谢通路。

统计学处理 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Graph-Pad Prism 7.0 (San Diego, USA) 进行统计和图形分析, 通过 Oneway-ANOVA 进行多组间差异比较, *P*<0.05 被认为具有显著性差异。

结果

1 动物外表观察及体重变化

与空白组的大鼠相比, *D*-gal 诱导的衰老大鼠会随着造模时间的增加出现一些衰老体征, 如毛发蓬乱易掉毛、毛色无光泽、背部皮肤弹性差、尾部发黄、体重增长缓慢、活动减少、行动及反应迟缓等^[2,10]。而给药黄芩根、茎、叶、花醇提物后, 上述现象出现不同程度的改善。此外, 造模前后所有组的大鼠体重变化如图 1 所示。统计学分析后, 连续 7 周皮下注射 *D*-gal 后的模型大鼠体重略高于空白组的大鼠, 但两组之间无显著性差异。与 *D*-gal 模型组的大鼠相比, 给药黄芩不同生长部位醇提物后的各组大鼠体重无显著性差异。以上结果表明 *D*-gal 造模及给药黄芩根、茎、叶、花醇提物均对大鼠体重无明显影响。

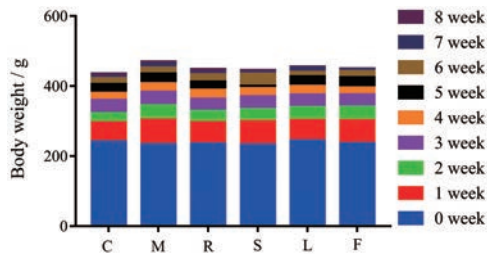


Figure 1 Effects of alcohol extracts from different growth sites of *Scutellaria baicalensis* Georgi (SBG) on body weight of *D*-galactose-treated rats. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. C: Control group; M: Model group of *D*-gal induced aging. R, S, L, F respectively represented the drug-treatment groups that given the roots, stems, leaves and flowers of SBG

2 黄芩根、茎、叶、花醇提取物对 *D*-gal 诱导的衰老大鼠行为学的影响

为评估黄芩不同生长部位的醇提取物对衰老大鼠空间学习记忆能力的改善作用,在水迷宫系统中对所有大鼠进行连续4天的训练并测试,通过定位航行和空间探索两部分实验考察^[17]。图2A反映了定位航行实验第1~5天各组大鼠的潜伏期变化。训练期间,*D*-gal 诱导的衰老大鼠的潜伏期略有下降,但寻找到平台的时间仍明显多于其他组。从实验第3天起,与正常组相比,模型组潜伏期明显延长。给药黄芩根、茎、叶、花醇提取物后,各给药组的潜伏期均较模型组缩短。图2B反映了第5天各组大鼠的潜伏期变化。相比于空白组,模型组的潜伏期明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比,给药黄芩茎、叶后,第5天的潜伏期明显下降 ($P < 0.01$); 给药黄芩花后,潜伏期下降 ($P < 0.05$),改善效果略低于黄芩茎叶; 给药黄芩根也可改善潜伏期,但无显著性差异。此外,在空间探索实验中,对大鼠穿越平台次数(图2C)和在目标象限内的活动时间(图2D)进行了分析。如图2C所示,与空白组相比,*D*-gal 诱导的大鼠的穿越平台次数明显减少 ($P < 0.001$),表明*D*-半乳糖致衰老的大鼠的空间探索能力下降。与模型组相比,连续给予*D*-gal 诱导的模型大鼠黄芩根、茎、叶、花醇提取物干预后,大鼠的探索能力有所改善。其中,给予黄芩茎 ($P < 0.001$) 和黄芩叶 ($P < 0.01$) 的大鼠的穿越平台次数明显增多,而给药黄芩根和黄芩花的两组大鼠的穿越平台次数增多,但无显著性差异。另外,如图2D所示,与空白组相比,模型组的大鼠在目标象限内的活动时间明显减少 ($P < 0.001$)。与模型组相比,连续给予*D*-gal 诱导的模型大鼠黄芩根干预后,该组的大鼠在目标象限内的活动时间明显增加 ($P < 0.01$),而给予黄芩茎、叶、花醇提取物的大鼠有极显著差异 ($P < 0.001$)。对以上行为学指标在各给药组间进行统计学分析,结果显示,

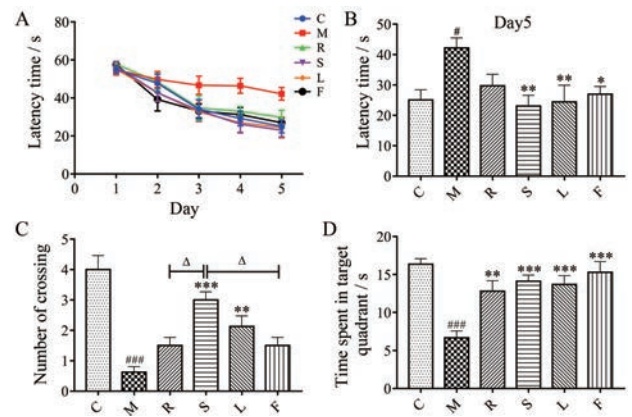


Figure 2 Alcohol extracts from different growth sites of SBG treatment improved *D*-gal-induced memory deficits in rats. A: The line chart of mean escape latency time (s) during training trial; B: The comparison of escape latency time (s) on day 5th of training trial; C: The comparison of number of crossing into the former location of the platform during the probe test; D: Comparison of time spent in the target quadrant escape latency time (s) during the probe test. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs drug-treated groups

黄芩茎给药组分别与黄芩根和花给药组 ($P < 0.05$) 有显著性差异,而与黄芩叶给药组无显著性差异。

从以上行为学多个指标来看,虽然源自同一植物基源,均具有不同程度的延缓衰老的作用,但黄芩根、茎、叶、花的药效具有明显差异。

3 *D*-gal 诱导衰老的大鼠尿液¹H NMR 图谱的代谢物指认

图3为具有代表性的空白大鼠尿液的核磁图谱,结合 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 和 BMRB (<http://www.bmrwisc.edu/>) 数据库,对比化学位移、峰型和耦合常数,共指认出32种内源性代谢物。大鼠尿液代

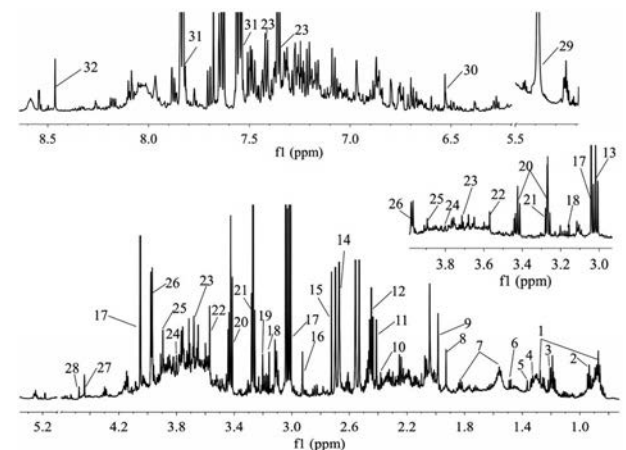


Figure 3 Typical 600 MHz ¹H NMR spectra of control rat for metabolites identified from the urine samples

谢产物十分复杂,主要是氨基酸类、有机酸类和酮体等物质(表1),而且24 h内各个大鼠排尿体积相差较大,因此在一般情况下无法通过肉眼观察的方式来发现各组大鼠尿液代谢物谱的差异,必须借助于多变量数据分析方法^[18]。

4 ¹H NMR图谱的多元统计分析

通过有监督模式的PLS-DA分析方法对各组样本进行代谢轮廓分析。图4A为所有组样本的PLS-DA散点图,空白组与模型组明显分开,表明皮下注射D-半乳糖造模7周后引起大鼠尿液代谢轮廓发生明显变化,衰老模型复制成功。从图中可以看出,黄芩根、茎、叶、花醇提取物4个给药组均与模型组明显分开,表明黄芩根、茎、叶、花醇提取物能改善大鼠尿液代谢异常。黄芩根相较于黄芩茎、叶、花更靠近模型组,黄芩叶相较于黄芩茎、花更远离模型组,黄芩茎、花给药组两组未明显区分开,说明黄芩根、茎、叶、花对衰老大鼠的尿液代谢轮廓改善作用略有差异。对所有组进行PLS-DA代谢轮廓分析后,对空白组和D-gal诱导的模型组进行外部模型验证。如图4B所示,发现模型拟合性好,预

测具有可靠性($R^2 = 0.936$, $Q^2 = -0.047$)。

为筛选潜在的尿液差异代谢物,采用有监督的OPLS-DA分析方法对D-gal致衰老的大鼠的内源性代谢物进行分析。图4C为空白组和模型组两组大鼠尿液的OPLS-DA散点图,两组明显区分开,且 $R^2X = 0.376$ 、 $R^2Y = 0.963$ 、 $Q^2 = 0.102$ 。根据潜在的生物标记物对差异的贡献,从S-plot图中提取潜在的生物标记物,并建议靠近S型两端尾部的代谢物具有良好的影响,变量偏离原点的距离越远,VIP的价值就越高。图4D为空白组和模型组两组大鼠尿液的S-plot图。在该图中,不同的点表示不同的代谢产物,离变量中心越远,变量对组分离的影响就越大。

5 尿液差异代谢物的筛选

本研究通过相应S-plot图(图4D)和VIP值(>1),从151个结果中筛选出22个可能的代谢物。根据代谢物相对峰面积进行t检验,根据P值小于0.05为标准筛选衰老的大鼠尿液中潜在生物标志物,通过对目标变量进行手动积分,共找到14个差异代谢物(图5),包括氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO)、甘氨酸、

Table 1 The list of the detailed ¹H NMR assignments from urine samples in rats. TMAO: Trimethylamine N-oxide; NAG: N-Acetyl-glycoproteins

No.	Metabolite	Moiety	δ_H (multiplicity)
1	Lipids	CH ₃ , (CH ₂) _n , C=CCH ₂ C=C	0.87 (m); 1.27 (m)
2	Isoleucine	δ CH ₃ , δ CH ₃ , δ CH ₃ , γ CH ₃ , γ CH ₃	0.94 (t), J = 7.20 Hz
3	3-Hydroxybutyrate	γ CH ₃	1.20 (d), J = 4.20 Hz
4	Lactate	α CH ₃ , β CH ₃	1.33 (d), J = 7.20 Hz
5	2-Hydroxyisobutyrate	CH ₃	1.36 (s)
6	Alanine	β CH ₃	1.48 (d), J = 7.20 Hz
7	Citrulline	γ CH ₂ , β CH ₂	1.56 (m); 1.83 (m)
8	Acetate	CH ₃	1.93 (s)
9	N-Acetyl-glycoprotein	CH ₃	2.04 (s)
10	Pyruvate	CH ₃	2.38 (s)
11	Succinate	CH ₂	2.41 (s)
12	α -Ketoglutarate	α CH ₂ , β CH ₂	2.44 (t), J = 7.20 Hz; 3.01 (t), J = 7.20 Hz
13	α -Oxoglutarate	γ CH ₂ , β CH ₂	2.46 (t), J = 6.60 Hz; 3.01 (t), J = 6.60 Hz
14	Citrate	Half CH ₂ , half CH ₂	2.54 (d), J = 15.00 Hz; 2.66 (d), J = 15.00 Hz
15	Dimethylamine	CH ₃	2.72 (s)
16	Dimethylglycine	N-CH ₃	2.92 (s)
17	Creatinine	CH ₃ , CH ₂	3.04 (s); 4.06 (s)
18	Malonate	CH ₂	3.15 (s)
19	Choline	N(CH ₃) ₃	3.20 (s)
20	Taurine	N-CH ₂	3.23 (t), J = 6.60 Hz; 3.42 (t), J = 6.60 Hz
21	TMAO	CH ₃	3.27 (s)
22	Glycine	CH ₂	3.57 (s)
23	Phenylacetyl glycine	2,6-CH; 3,5-CH	3.68 (s); 7.36 (m); 7.42 (m)
24	Guanidinoacetate	CH ₂	3.80 (s)
25	Betaine	CH ₃ , CH ₃	3.90 (s)
26	Hippurate	CH	3.97 (s), 7.55 (t), J = 7.20 Hz; 7.64 (t), J = 7.20 Hz; 7.84 (d), J = 7.80 Hz
27	Trigonelline	N-CH ₃ , 1-CH	4.44 (s); 9.13 (s)
28	N-Methyl-nicotinamide	CH ₃	4.48 (s); 9.29 (s)
29	Allantoin	CH	5.38 (s)
30	Fumarate	CH, CH ₃	6.53 (s)
31	Benzoate	CH ₂	7.55 (t), J = 7.20 Hz; 7.88 (d), J = 7.20 Hz
32	Formate	CH	8.46 (s)

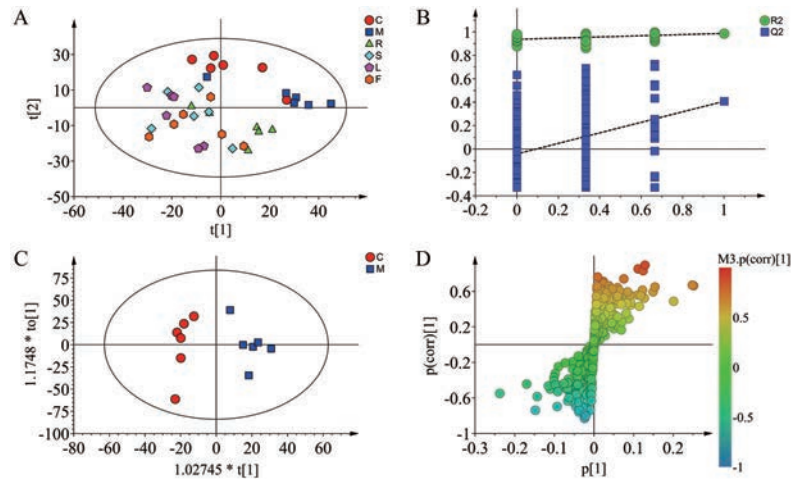


Figure 4 The metabolic profiles of urine samples. A: The Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) score plot among the six groups; B: Validation plot obtained from 200 permutation tests for the PLS-DA models of normal and model groups; C: The orthogonal projection to latent structure discriminant analysis (OPLS-DA) score plot from the control and *D*-gal induced aging groups; D: The S-plots of OPLS-DA score plot between the control and model groups

丙氨酸、乳酸、二甲基甘氨酸、醋酸盐、丙酮酸、牛磺酸、马尿酸、尿囊素、甜菜碱、*N*-乙酰化糖蛋白、 α -酮戊二酸、3-羟基丁酸。与空白组相比,模型组中 α -酮戊二酸、马尿酸和3-羟基丁酸含量明显降低 ($P < 0.05$),其他代谢物含量明显增加。给予黄芩根、茎、叶、花醇提物能对上述差异代谢物进行不同程度的调节,其中黄芩叶能显著调节8个,包括TMAO、丙氨酸、乳酸、二甲基甘氨酸、醋酸盐、牛磺酸、尿囊素和甜菜碱。黄芩花能显著调节4个:TMAO、醋酸盐、牛磺酸和尿囊素。黄芩茎醇提物能显著调节3-羟基丁酸、醋酸盐和牛磺酸。黄芩根能显著调节3-羟基丁酸和马尿酸。此外,对各给药组之间进行统计学分析,结果显示,所有涉及的代谢物中,各给药组之间均无显著性差异。以上结果表

明黄芩根、茎、叶、花醇提物可以对衰老大鼠排泄的尿液中涉及的差异代谢物进行调节,且黄芩叶能调节更多的差异代谢物。

6 尿液中差异代谢物的相关代谢通路分析

将在大鼠尿液中找到的14种潜在生物标志物导入到Metaboanalyst (<http://www.Metaboanalyst.ca>)数据库,研究与衰老相关的代谢通路。如图6A所示,代谢通路影响值 (pathway impact) 由拓扑分析计算所得,代谢通路影响值和 $-\log P$ 分别代表代谢通路的重要性和代谢通路富集分析的显著性水平。本研究中选择代谢通路影响值的临界设置为0.10,高于这个值认为与潜在的靶标路径关系密切。共筛选出6条通路:牛磺酸和亚牛磺酸代谢;甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;丙酮

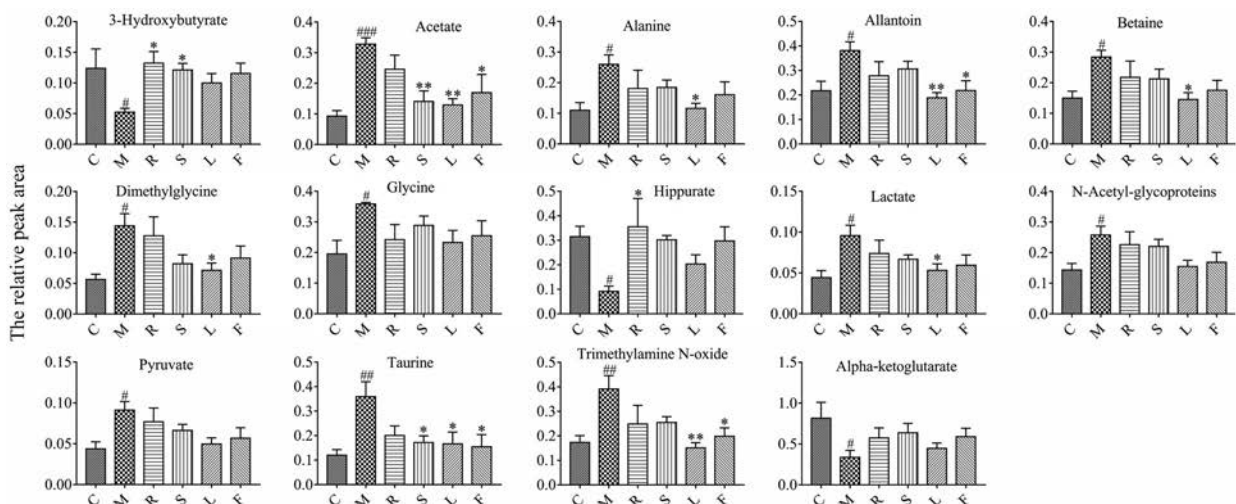


Figure 5 Potential biomarkers of urine samples detected between control and model groups. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

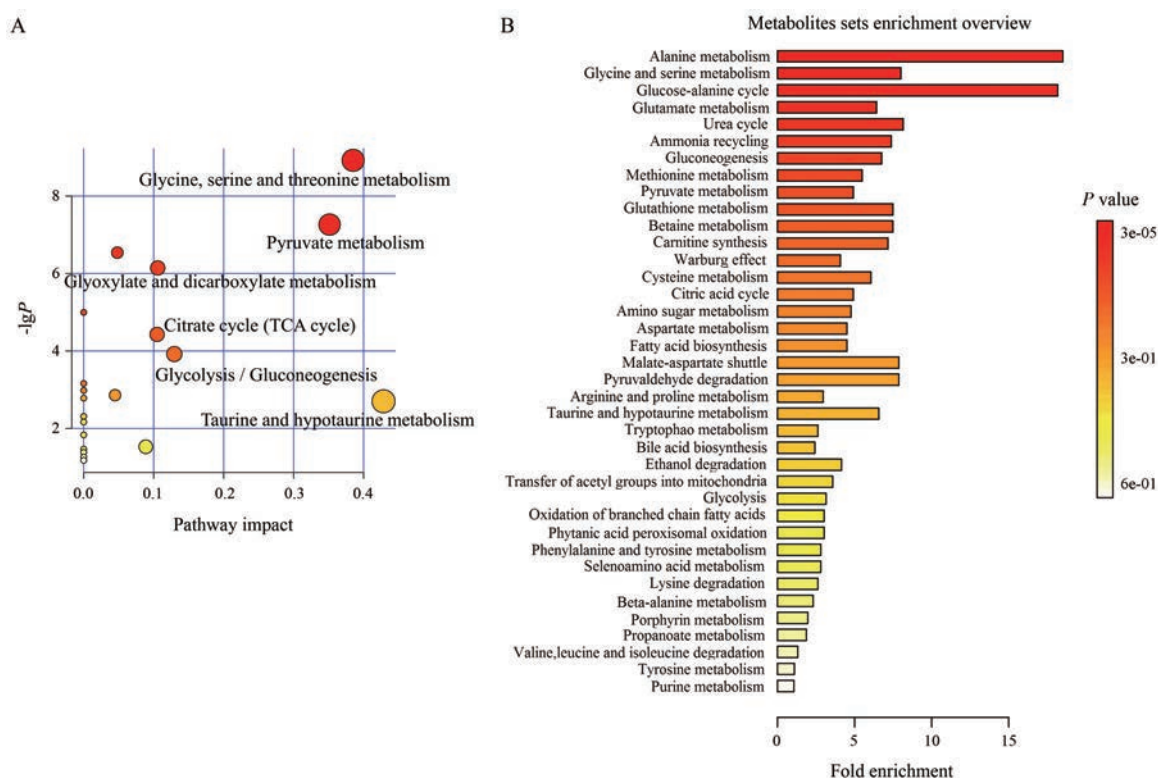


Figure 6 Pathways analysis of urine in rats. A: Summary of pathways analysis. Each point represents one metabolic pathway, the size of the dot and shades of color represent positive correlations with the impact of the metabolic pathways; B: Fold enrichment analysis. The perturbed metabolic pathways were evaluated by enrichment pathway analysis of the urine samples from *D*-gal induced aging rats compared to that from normal rats. The upper pathways in red changed more significantly and have higher *P* values; longer bars have higher fold enrichment values and *vice versa*

酸代谢;糖酵解/糖异生;乙醛酸和二羧酸的代谢;三羧酸循环。

将 14 种潜在生物标志物导入到 Metaboanalyst 数据库,对涉及的代谢通路进行富集分析,以进一步研究内源性代谢产物与代谢途径之间的关系(图 6B)。越往上,颜色越红,具有较高的 *P* 值,同时,较长的柱具有较高的倍富集值,反之亦然。富集分析找到的一些途径,例如丙氨酸代谢;甘氨酸、丝氨酸代谢;丙酮酸代谢;三羧酸循环等,与本文尿液代谢组学找到的代谢途径一致。此外,与本课题组前期对衰老大鼠的血清和肝脏进行代谢组学所做的结果相一致,均表明这些通路与衰老疾病的相关性。

为了更好地研究黄芩根、茎、叶、花醇提物对 *D*-gal 造模改变的代谢物的影响,分别将给药组调节的代谢物输入到 MetPA 中,结果发现,黄芩叶调节的代谢通路有牛磺酸和亚牛磺酸代谢;甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;丙酮酸代谢。黄芩茎和黄芩花醇提物均可以调节牛磺酸和亚牛磺酸代谢。利用 KEGG 数据库对与衰老相关的代谢通路及黄芩叶调节所涉及的生物标志物进行关联分析(图 7),以探讨生物标志物之间的关联

性。其中,黄芩叶对尿液样本中内源性代谢物的调节趋势已在图 7 中用绿色箭头标注。

7 血清和尿液样本差异代谢物整合分析

表 2 为基于 ¹H NMR 代谢组学分析技术对 *D*-gal 诱导的衰老模型大鼠的血清和尿液样本寻找到的差异代谢物。与空白组相比较,模型组血清样本中找到 17 种差异代谢物,尿液样本中找到 14 种差异代谢物,这些代谢物的含量呈现升高或者降低的趋势,且具有显著性差异。其中,7 种差异代谢物同时出现在两种分析样本中,包括 3-羟基丁酸、乳酸、甘氨酸、牛磺酸、丙酮酸、丙氨酸、乙酸。

本研究对两种样本中相同给药剂量下不同生长部位调节的代谢物数量进行统计分析,如图 8 所示。在血清样本中,黄芩根醇提物可以显著调节代谢物 8 种、茎调节 6 种、叶调节 12 种、花调节 7 种;在尿液样本中,黄芩根醇提物可调节 2 种差异代谢物、茎调节 3 种、叶调节 8 种、花调节 4 种。这些结果说明,在不同样本中,黄芩根、茎、叶、花醇提物均能在一定程度上改善衰老大鼠的机体代谢。给药黄芩不同生长部位醇提物后,不同样本中相同给药组中调节的差异代谢物的数量不

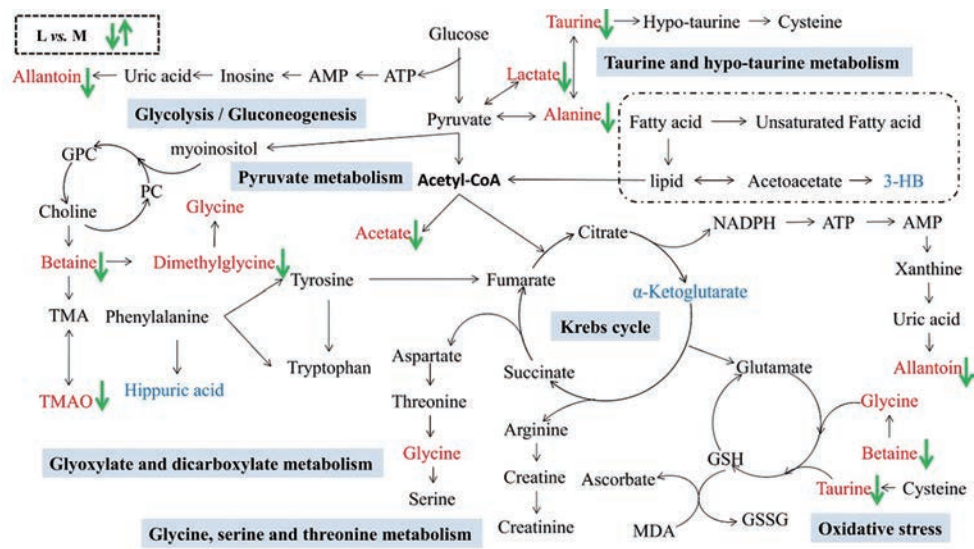


Figure 7 Alterations of metabolites and possible metabolic pathways in urine samples of aging rats. The metabolites in blue font were decreased and red font were increased in urine of model rats, compared with the normal rats. And the arrow in green represented the altered trends of metabolites that were regulated by the leaves of SBG, compared with the model group

Table 2 The summary of the metabolites based on ¹H NMR analysis from the serum and urine samples in rats

No	Differential metabolites (C vs M)	Serum		Urine	
		C vs M	Regulated	C vs M	Regulated
1	Isobutyric acid	↓	R, S, L		
2	3-Hydroxybutyric acid	↓	R, L	↓	R, S
3	Lactate	↓	R, L	↑	L
4	Acetone	↑	R, S, L		
5	Threonine	↑	R, S, L		
6	Leucine	↑	L		
7	Lysine	↑	R, S, L		
8	Glutamate	↑	R, S, L, F		
9	Glutamine	↑	S, L, F		
10	Glycine	↑	L, F	↑	
11	Glycerol	↑	R, L		
12	Guanidinoacetate	↑	L		
13	Taurine	↓		↑	S, L, F
14	Valine	↓	F		
15	Pyruvate	↑	F	↑	
16	Acetate	↑	F	↑	S, L, F
17	Alanine	↑	F	↑	L
18	TMAO	↑		↑	L, F
19	Dimethylglycine			↑	L
20	Hippuric acid			↓	R
21	Allantoin			↑	L, F
22	Betaine			↑	L
23	NAG			↓	
24	α-Ketoglutarate			↓	

同。如黄芩叶醇提物可以回调血清样本中的 12 种代谢物, 在尿液样本中的 8 种, 且其调节的代谢物种类多于根、茎、花醇提物。

讨论

衰老是一个复杂的分子和生物化学过程。文献报道机体的认知能力会随着年龄的增长而下降^[19]。

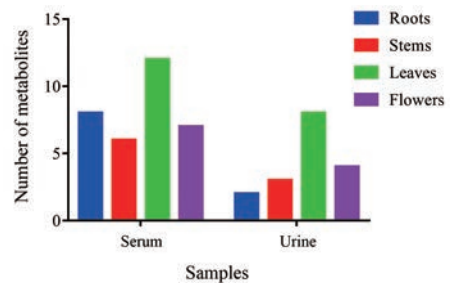


Figure 8 Number of metabolites regulated by the different drug-treatment groups that given the roots, stems, leaves and flowers of SBG between the serum and urine samples

Morris 水迷宫实验可以反映大鼠的空间学习记忆能力, 可用于判断衰老模型是否成功^[20]。本实验的行为学研究结果表明, 相较于空白组的大鼠, 连续皮下注射 *D*-gal 诱导的模型大鼠潜伏期较长, 穿越平台次数明显减少, 在目标象限内的活动时间也明显减少。黄芩根、茎、叶、花醇提物干预后, 以上行为学指标出现不同程度的改善, 说明黄芩不同部位的醇提物具有不同程度的延缓衰老的作用。

本文进一步采用 ¹H NMR 核磁代谢组学技术对各组大鼠的尿液样本进行分析, 并比较了黄芩根、茎、叶、花醇提物对差异代谢物的改善作用。对代谢谱进行多元统计分析, 研究结果表明, 相较于空白组, 模型组中有 14 个显著性差异的代谢物, 主要涉及 6 条代谢通路。这些代谢通路暗示衰老的作用机制多与氨基酸代谢和能量代谢等有密切的相关性。此外, 相较于黄芩根、茎、花醇提物, 黄芩叶醇提物在血清和尿液样本中均能

调节更多的代谢物。理解这些差异代谢物的生物学意义可能对于研究衰老的作用机制以及对研究黄芩不同部位醇提物抗衰老的作用机制提供一种思路,进而为黄芩资源开发提供依据。

脂质和葡萄糖是能量代谢的主要原料,在无氧条件下,葡萄糖会经过糖酵解过程转变成乳酸或者丙酮酸,并在此过程中生成ATP^[21]。糖酵解中间体也可以被分流到合成代谢的途径中,例如磷酸戊糖、3-磷酸甘油、丝氨酸或甘氨酸^[22]。本研究结果显示,相对于空白组,模型组中乳酸、丙酮酸、甘氨酸明显上升。这种现象与之前文献^[11,12,15,23]报道一致,说明衰老大鼠的糖代谢发生紊乱,推测与葡萄糖增加或利用率下降,丙酮酸使用减少以及厌氧性糖酵解增加等有关,导致与糖代谢相关的代谢物出现不同程度的升高。此外,在衰老过程中,氧化应激可能会增加,继而增加乳酸脱氢酶的浓度,导致乳酸含量增加^[24],而过量的乳酸又会导致机体能量消耗增加,还可诱发氧化损伤和线粒体损伤,进而加速细胞损伤、凋亡和衰老^[25],而给药黄芩叶醇提物后,乳酸含量能显著性回调。三羧酸循环是机体获得能量的主要方式之一,更是糖、脂肪和氨基酸代谢的联系通路,糖、蛋白质、脂肪酸等大分子物质的生物氧化均与之有关。丙酮酸是通过氧化脱羧生成乙酰CoA参与三羧酸循环^[26]。 α -酮戊二酸是三羧酸循环的中间产物,模型组中丙酮酸含量增加以及 α -酮戊二酸含量降低,说明机体的三羧酸循环某些环节受阻,导致三羧酸循环异常。而给药黄芩根、茎、叶、花醇提物后,趋势有所改善,但无显著性差异,可能与给药剂量有关。3-羟基丁酸是一种酮体,在线粒体中能被3-酮脂酰辅酶A转移酶催化生成乙酰辅酶A和琥珀酸进入三羧酸循环,本研究中,尿液样本中模型组的3-羟基丁酸含量降低,可能在机体中经代谢进入三羧酸循环以供能。此外,3-羟基丁酸是脂肪酸在肝内 β 氧化后正常的代谢中间产物,是肝脏输出能源的一种形式,其水平降低可能是由于D-gal导致脂肪酸的 β 氧化功能受到抑制所致^[27]。模型组的尿液样本中乳酸、甘氨酸、丙酮酸含量显著升高, α -酮戊二酸、3-羟基丁酸含量明显降低,这与本课题组前期对衰老大鼠的肝脏和血清样本进行¹H NMR代谢组学分析的研究结果^[3,4,11,12]一致,均说明机体的能量代谢紊乱。此外,甜菜碱在脂肪代谢中起着关键作用,本研究中,甜菜碱在模型组中含量有所上升,提示衰老可能与脂肪酸的 β -氧化减少相关。进一步证明体内糖酵解和脂肪酸 β -氧化过程产生的乙酰CoA不能完全进入三羧酸循环氧化产生能量。本研究模型组尿液样本中的醋酸水平升高,推测原因可能是部分乙酰CoA在乙酰CoA水解酶的作用下被水解为

醋酸,使得尿液中醋酸水平升高^[26]。

氮氧三甲胺是由肠道微生物将胆碱降解为三甲胺,继而氧化生成的^[28];而马尿酸的母体苯甲酸和苯乙酸也是由肠道细菌的作用产生的^[26],本研究结果显示,相较于空白组,模型组尿液样本中氧化三甲胺含量显著升高,马尿酸含量显著降低,均提示衰老大鼠肠道内的菌群代谢发生紊乱。此外,马尿酸作为衡量肝脏能量代谢的指标,线粒体氧化磷酸化的过程受到影响可导致马尿酸合成的障碍^[29]。线粒体功能障碍与氧化应激密切相关,而氧化应激被认为是造成衰老的关键因素之一。文献^[30]报道牛磺酸能减少线粒体中丙二酸的生成,提高内源性氧自由基清除剂的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活力,发挥抗氧化作用。本研究中,模型组尿液样本中的牛磺酸含量增加,说明机体利用的牛磺酸减少,牛磺酸和亚牛磺酸代谢紊乱,经黄芩茎、叶、花醇提物干预后其含量有所回调。在嘌呤代谢中,黄嘌呤氧化酶可将黄嘌呤转化为尿酸,同时产生活性氧簇(ROS),尿酸被ROS进一步氧化成尿囊素,因此尿囊素也被认为是氧化应激的候选生物标志物之一^[28]。在本实验中,模型大鼠尿液中尿囊素含量升高,而给药黄芩叶、花醇提物后尿囊素含量显著回调,说明黄芩叶、花醇提物可以通过抑制黄嘌呤氧化酶通路以减轻衰老大鼠体内氧化应激反应。氧化应激反应增加,免疫功能减弱以及炎症稳态失衡,伴随着细胞信号的功能衰退,均可加速衰老相关疾病的发生^[31]。N-乙酰糖蛋白是一种炎症介质,对免疫功能的维持具有重要作用。衰老大鼠尿液中N-乙酰糖蛋白含量增加,可能促进炎症进而加速衰老。

此外,本课题组前期对大鼠血清样本进行¹H NMR代谢组学分析^[2,10,11],结合本实验结果,相较于空白组,模型组大鼠的两种分析样本中共找到24种差异代谢物。结果发现不同分析样本找到的差异代谢物略有不同,这可能与机体的代谢以及不同组织的功能密切相关。但不同的分析样本中,相同代谢物的变化趋势基本一致,如乳酸、3-羟基丁酸和甘氨酸。虽然源自同一植物基源,但黄芩根、茎、叶、花醇提物对同一差异代谢物的调节程度不一致,这可能与黄芩根、茎、叶、花的化学成分差异有关^[2,10]。基于血清和尿液样本的分析结果,发现黄芩叶调节的代谢物均多于根、茎、花醇提物,暗示黄芩叶的抗衰老效果可能优于根、茎、花。不足之处主要有三个方面,首先,本课题组前期并未对黄芩根、茎、叶、花醇提物平行进行¹H NMR的肝脏代谢组学分析,未能得出黄芩根、茎对肝脏差异代谢物的调节状况,本研究亦未对尿液样本进行动态变化监测,未能得出尿液代谢物在衰老造模过程中的代谢物变化情

况。其次,相较于液质联用技术,¹H NMR 代谢组学分析方法仅鉴定了 32 个代谢物,数目非常少,由于覆盖的代谢物较少,而且以高丰度成分为主,该研究有一定的局限性,无法全面地反映体内代谢网络的变化。最后,在其他模型条件下是否会出现黄芩叶调节的代谢物多于根、茎、花醇提物尚待进一步探讨。

总之,本文利用代谢组学分析研究 *D*-半乳糖致衰老大鼠尿液代谢轮廓的变化,结合多元统计分析,研究结果表明黄芩根、茎、叶、花醇提物能够对衰老大鼠尿液样本中的差异代谢物的含量进行不同程度的调节,对衰老大鼠的代谢紊乱起到一定的改善作用,且黄芩叶醇提物的改善作用强于根、茎、花。

作者贡献: 杜冠华、秦雪梅、周玉枝负责研究思路的提出;柴建新、陈强、李萌茹进行实验并收集数据;周玉枝、高丽提供撰写思路及修改论文;李萌茹查阅部分文献,处理数据,撰写草稿。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突: 所有作者均无相关利益冲突。

References

- [1] Mo R, Wei ZM, Yang YS. Advances in research of anti-aging mechanism [J]. Med J Chin PLA (解放军医学杂志), 2017, 42: 743-748.
- [2] Song J. Protective Effect of *Scutellaria baicalensis* Flowers on Aging Rats and Regulation Mechanism Based on Glutamine - Glutamate Metabolic Pathway (黄芩花抗衰老作用及其对谷氨酰胺—谷氨酸代谢通路的调节机制研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.
- [3] Wang KX, Gao L, Duan DD, et al. Effects of baicalein on *D*-galactose-induced aging rats based on ¹H-NMR metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 511-518.
- [4] Zhao FF, Chang YF, Gao L, et al. Protective effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract on *D*-galactose induced aging rats [J]. Metab Brain Dis, 2018, 33: 1401-1412.
- [5] Duan DD, Wang KX, Zhou YZ, et al. Baicalein exerts beneficial effects in *D*-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction [J]. Rejuvenation Res, 2017, 20: 506-516.
- [6] Duan DD, Gao L, Wang KX, et al. Baicalein prolongs the lifespan of *Drosophila melanogaster* through antioxidation activity [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1401-1406.
- [7] Xue LY. Study on Screening and Mechanism of Anti-aging Effective Ingredients of *Scutellaria baicalensis* (黄芩抗衰老有效成分筛选及其机制研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2018.
- [8] Zhou F, Li JQ, Wang KX, et al. Metabolomics-based study of metabolic changes in liver tissues of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) treated with baicalein [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 2604-2611.
- [9] Li JQ, Gao L, Wang KX, et al. Fecal metabolome and gut microbiome alterations in a mouse model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 2265-2273.
- [10] Pang YY. The Anti-aging Effect and Spectrum-Effect Study of Different Parts of *Scutellaria baicalensis* Georgi (黄芩根、茎、叶抗衰老作用及谱效关系研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.
- [11] Pang YY, Zhou YZ, Song J, et al. Anti-aging effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi leaves based on ¹H NMR serum and liver metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 74-82.
- [12] Song J, Pang YY, Gao L, et al. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi flowers on *D*-galactose induced aging in rats based on serum metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 533-539.
- [13] Song J, Zhou YZ, Pang YY, et al. The anti-aging effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi flowers extract by regulating the glutamine-glutamate metabolic pathway in *D*-galactose induced aging rats [J]. Exp Gerontol, 2020, 134: 110843.
- [14] Li F, Xu Q, Zheng T, et al. Metabonomic analysis of allium macrostemon bunge as a treatment for acute myocardial ischemia in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 225-234.
- [15] Chang YF, Gong WX, Zheng YH, et al. Urinary metabolomics study of the effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi ethanol extract on *D*-galactose-induced rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 86-92.
- [16] Chang YF. ¹H NMR Based Metabonomic Study of the Anti-aging Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi (基于代谢组学的黄芩抗衰老作用评价及机制研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016.
- [17] Haider S, Saleem S, Perveen T, et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system [J]. Age (Dordr), 2014, 36: 9653.
- [18] Zhou ZJ, Xie YY, Gong MJ, et al. Urine metabonomic study of intervention effects of *Morinda officinalis* How. on 'Kidney-yang deficiency syndrome' [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1733-1737.
- [19] Dahan L, Rampon C, Florian C. Age-related memory decline, dysfunction of the hippocampus and therapeutic opportunities [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 102: 109943.
- [20] Rehman SU, Shah SA, Ali T, et al. Anthocyanins reversed *D*-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54: 255-271.
- [21] Yu JQ. Exploring the Potential Biomarkers for Diagnosis and Classification of Lung Cancer by Non-targeting and Targeted Metabolomics (基于非靶标和靶标代谢组学的肺癌诊断及分型生物标志物研究) [D]. Nanchang: Nanchang University,

- 2019.
- [22] Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging [J]. *Development*, 2013, 140: 2535-2547.
- [23] Zhao FF, Gao L, Qin XM, et al. The intervention effect of licorice in *D*-galactose induced aging rats by regulating the taurine metabolic pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 4814-4821.
- [24] Zhang X, Liu H, Wu J, et al. Metabonomic alterations in hippocampus, temporal and prefrontal cortex with age in rats [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54: 481-487.
- [25] Zhao FF. The Effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch on *D*-gal Induced Aging Rats and the Analysis of the Target Metabolomics Based on Taurine Pathway (甘草对 *D*-gal 诱导的大鼠抗衰老作用及基于牛磺酸通路的靶标代谢组学研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2018.
- [26] Wang L, Song M, Hang TJ, et al. Metabonomic study on the effects of allicin on rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 1019-1024.
- [27] Qu WL. Study on Evaluation of the Effectiveness and Mechanism of Qiong-yu Extract Anti-aging Effect on Metabonomics (基于代谢组学的琼玉膏延缓衰老作用评价及机制研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [28] Guo Q, Li XJ, Guo HR, et al. The urinary metabolomics of *Astragalus Radix* and *Dioscoreae Rhizomacomes* reveal possible therapeutic mechanisms in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 83-90.
- [29] Zhao JW, He JL, Ma ZC, et al. Urine metabolomics studies of Shenfu attenuated compatibility [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2015, 31: 1-5.
- [30] Yang M, Hu ZX, Li L, et al. Effects of shenmai injection on urine metabolomics of hypertensive heart failure model rats [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2020, 61: 334-339.
- [31] Li MR, Zhou YZ, Du GH, et al. Research progress about the anti-aging effect and mechanism of flavonoids from traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1382-1391.