

代谢组学探索复方二仙汤调节双侧去卵巢大鼠脂代谢紊乱特征

生 宁[#], 王彩虹[#], 贾志鑫, 王 喆, 吴彩胜^{*}, 张金兰^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 卵巢功能的永久性丧失造成的妇女更年期与脂质代谢紊乱密切相关, 复方二仙汤临床上用于多种妇科疾病的治疗, 对与卵巢功能的永久性停止有关的疾病有良好疗效, 而其作用机制尚未明确。本研究采用代谢组学技术, 以双侧去卵巢模型大鼠模拟更年期妇女的生理状态, 探索不同绝经阶段脂质代谢特征以及二仙汤调节更年期脂代谢紊乱可能的代谢通路和机制。结果表明, 双侧去卵巢模型大鼠发生肝脂代谢异常, 与对照组比较, 模型组肝脏油红O染色切片发生显著性变化。与模型组比较, 复方二仙汤组能显著改善肝脂代谢。动态代谢组学分析结果表明二仙汤对双侧去卵巢模型引起的脂代谢紊乱具有实时调节作用。生物统计学分析找寻得到46个(6个甾体激素、3个鞘酯、11个甘油磷脂和26个甘油酯) 血浆潜在生物标志物和32个(1个甾体激素、20个甘油磷脂和11个甘油酯) 肝脏潜在生物标志物。分析差异代谢通路并构建了二仙汤显著调节的脂质代谢网络, 为深入了解更年期状态下脂代谢紊乱渐进变化和复方二仙汤调节作用特点和机制提供了有价值的信息。研究遵守中国医学科学院药物研究所动物实验伦理委员会制定的规程并通过动物实验伦理审查(No. 00000918)。

关键词: 复方二仙汤; 代谢组学; 双侧去卵巢模型大鼠; 脂代谢紊乱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2403-07

The mechanism of Er-xian Decoction in regulating lipid metabolism disorders on bilateral ovariectomized rats based on metabolomics study

SHENG Ning[#], WANG Cai-hong[#], JIA Zhi-xin, WANG Zhe, WU Cai-sheng^{*}, ZHANG Jin-lan^{*}

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Studies have shown that women's menopause caused by permanent cessation of ovarian function is closely related to lipid metabolism disorders. Er-xian Decoction has been used in the clinical treatment for gynecological diseases and has a good effect on diseases related to reduced sex hormone function. In this study, metabolomics was performed on bilateral ovariectomized model rats within 12 weeks after modeling to mimic the physiological state of menopausal women in different menopausal stages and Er-xian Decoction dosed model rats. The results of liver oil red O staining sections showed lipid metabolic disorder of bilateral ovariectomized model rats and the regulating effects of Er-xian Decoction. 46 potential biomarkers (6 steroid hormones, 3 sphingolipids, 11 phospholipids and 26 glycerides) in plasma and 32 potential biomarkers (1 steroid hormones, 20 phospholipids and 11 glycerides) in liver were obtained based on lipidomics analysis. Then, we analyzed the differential metabolic pathways and construct the lipid metabolism network significantly regulated by Er-xian Decoction. The results provided valuable information for in-depth understanding of the gradual changes on lipid metabolism disorders under menopausal conditions and the characteristics and mechanisms of compound Er-xian Decoction's regulatory

收稿日期: 2021-04-29; 修回日期: 2021-08-15.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-010).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者E-mail: wucsh@xmu.edu.cn; zhjl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0649

effects. The study complied with the procedures established by the Animal Experiment Ethics Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and passed the animal experiment ethics examine (No. 00000918).

Key words: Er-xian Decoction; metabolomics; bilateral ovariectomized model rats; lipid metabolism disorder

妇女更年期是指卵巢功能的永久性停止, 导致卵巢生成的雌激素和孕激素减少。已有文献报道, 更年期与脂质代谢紊乱密切相关, 包括低密度脂蛋白 (LDL)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 和高密度脂蛋白 (HDL) 等代谢紊乱^[1]。临床采用雌激素补充疗法 (HRT), 预防和缓解雌激素缺乏引起的代谢综合征, 但绝经后妇女服用雌激素将增加中风、乳腺癌和卵巢癌等疾病风险^[2]。中药复方, 如中药复方二仙汤, 通过调节激素系统平衡, 临床上已应用于治疗更年期综合征^[3-7]。但二仙汤的作用特点和机制尚不明确。

代谢组学用于研究外界刺激和内在病理生理改变后内源性脂质代谢物的变化规律^[8-10]。目前, 已有研究采用代谢组学的方法和技术探索二仙汤对双侧去卵巢大鼠的调节作用^[11]。但是只针对更年期或双侧去卵巢的某一阶段 (多为12周), 忽略了整个病理或治疗过程。绝经过渡期分期系统 (the stages of reproductive aging workshop, STRAW) 将妇女绝经分为多个阶段^[12], 不同绝经阶段促卵泡激素的含量不同, 不同阶段表征病理和治疗的生物标志物可能不同, 但相关研究未考虑时间因素, 而以不同阶段表征病理和治疗生物标志物诠释病理机制和药效作用机制更加准确, 也更具实际意义。

本文利用实验室已建立的代谢组学技术, 对假手术组、模型组和二仙汤给药组血浆和肝组织样本中鞘脂、磷脂、甘油酯和甾体激素等代谢物轮廓进行分析, 研究不同绝经阶段双侧去卵巢大鼠的代谢组学和去卵巢后大鼠的脂质代谢特征, 从脂质合成与代谢通路角度, 研究二仙汤调节更年期脂代谢紊乱的特点和可能机制。

材料

药物与试剂 淫羊藿 (*Epimedii Folium*)、仙茅 (*Curculiginis Rhizoma*)、知母 (*Anemarrhenae Rhizoma*)、黄柏 (*Phellodendri chinensis Cortex*)、巴戟天 (*Morinda officinalis Radix*) 和当归 (*Angelicae sinensis Radix*) 药材购自北京同仁堂有限责任公司。磷脂内标包括 PC(17:0/20:4), 批号: LM1002; LPC(17:1/0:0), 批号: 855676; PS(17:0/20:4), 批号: LM1302; PE(17:0/20:4), 批号: LM1102, 均购自 Avanti Polar Lipids 公司, 纯度均 > 99%。甘油酯内标 I (d_5 -DG(16:1/16:1) 和 d_5 -DG(18:1/18:1)), 批号: LM6004; 甘油酯内标 II (d_5 -TG(20:

5/22:6/20:5) 和 d_5 -TG(20:0/20:1/20:0)), 批号: LM6000, 均购自 Avanti Polar Lipids 公司, 纯度均 > 99%。尼尔雌醇对照品, 批号: 100239-202003, 购自中国食品药品检定研究院, 定量用对照品。

仪器 美国 Agilent 公司高效液相色谱仪 (1290 UHPLC 和 1200 RRLLC 系统), 配备高压泵、自动进样器、脱气机、柱温箱等; 三重四极杆质谱仪 (6490 和 6410B 质谱), 配备 AJS 电喷雾离子源 (AJS-ESI 源), Masshunter 6.0 和 Masshunter 3.0 数据处理系统; 美国 Thermo Scientific 公司线性离子阱-傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (LTQ-FT 质谱), 配备电喷雾离子源 (ESI 源) 和 Xcalibur 7.0 数据处理系统。

实验动物 雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 250 ± 25 g, 12 周左右, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于中国医学科学院药物研究所无特殊病原体级动物实验中心, 12 h 光照/黑暗循环, 恒温恒湿 (23 ± 2 °C, 55% ± 5%), 于实验前饲养适应一周。实验动物可自由饮水进食, 研究遵守中国医学科学院药物研究所动物实验伦理委员会制定的规程并通过动物实验伦理审查 (No. 00000918)。

复方二仙汤给药液配制 分别称取淫羊藿 90 g、仙茅 90 g、知母 60 g、黄柏 60 g、巴戟天 90 g 和当归 90 g, 加入去离子水 4.8 L, 煎煮 2 h, 滤过。残渣加 4.8 L 去离子水重复煎煮 1 h。合并煎煮液, 45 °C 水浴减压蒸至 640 mL, 即得 (每毫升药液相当于 0.75 g 所有干重药材)。

动物分组、造模和给药 将 120 只大鼠随机分为 2、4 和 12 周大组, 每大组 40 只。每大组又随机细分为假手术组 (Sham)、模型组 (OVR)、二仙汤组 (EXD) 和尼尔雌醇组 (NYL), 每组 10 只。术前 12 h 禁食, 4 h 禁水。10% 水合氯醛 (400 mg·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉, 经背部切口, 摘除双侧卵巢。假手术组不摘除双侧卵巢, 其他操作与模型组相同。手术后, 各组大鼠正常饮食 1 周, 使恢复创伤。手术后第 2 周开始给药, 假手术组、模型组、二仙汤组和尼尔雌醇组分别灌胃给予 0.9% 氯化钠注射液 (10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、0.9% 氯化钠注射液 (10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、二仙汤 (相当于二仙汤生药量 7.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹) 和尼尔雌醇 (4 mL·kg⁻¹·w⁻¹)。

样本采集 选取 2、4 和 12 周组大鼠用于激素和脂

质化合物测定: 分别于首次给药后 2、4 和 12 周腹主动脉取血, 全血肝素抗凝, $1\ 721 \times g$ 离心 10 min 后取血浆, 于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻保存, 待测。大鼠处死后迅速取出肝脏, 冰 0.9% 氯化钠注射液清洗, 吸水纸拭干后取约 $1\ \text{cm}^3$ 固定部位肝脏组织, 浸入 10% 福尔马林溶液固定, 用于制作油红染色所需要肝脏切片; 其余肝脏迅速置于液氮中冷冻, 于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存, 用于代谢组学测定。

染色切片检查 将肝脏组织包埋于 OCT 包埋剂中并置于液氮中速冻, 制成 $7\ \mu\text{m}$ 厚切片, 10% 福尔马林溶液固定 10 min, 自来水洗净, 60% 异丙醇润洗数秒后用 0.3% 油红 O 的异丙醇溶液滴染 15 min, 60% 异丙醇稍洗后蒸馏水冲洗并用苏木素复染细胞核, 显微镜观察肝脏脂质堆积情况。

样本处理 磷脂、甘油酯和鞘脂: 采用甲基叔丁基醚 (MTBE)-甲醇-水三相提取法进行提取; 甾体激素: 参考本课题组已发表文献^[13], 丹磺酰氯和吉拉德 P 为衍生化试剂。

化合物测定 按实验室已建立的分析方法测定鞘脂、磷脂、甘油酯和甾体激素类代谢物的样本含量^[13-15]。

数据处理 鞘脂和甾体激素类化合物通过 MassHunter 定量软件进行积分, 磷脂和甘油酯类化合物的含量采用脂质数据分析软件 Lipid Data Analyzer (Graz University of Technology, Graz, Austria) 利用高分辨数据进行识别和积分。计算代谢物峰面积与定量内标峰面积的比值, 代入内标基质标准曲线进行定量分析。

统计分析和通路分析 采用 SPSS 18.0 软件 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 比较体重、甾体激素和脂质化合物 (鞘脂、磷脂和甘油酯) 组间差异, 具体过程如下: ① 采用夏皮罗-威尔克 W 检验 (Shapiro-Wilk W test) 检验变量是否符合正态分布分类; ② 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对符合正态分布的变量进行组间比较, 寻找组间有差异的变量, 界定显著性差异的临界值为 $P < 0.05$; ③ 采用曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U test) 对不符合正态分布的变量进行组间比较, 寻找组间有差异的变量, 界定显著性差异的临界值为 $P < 0.05$ 。

采用 Simca.P+12.0.1 软件 (Umetrics, Umeå, Sweden) 对所有甾体激素和脂质化合物 (鞘脂、磷脂和甘油酯) 数据进行正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA), 寻找潜在生物标志物。采用 R^2Y (cum) 值评估 OPLS-DA 模型的稳定性, Q^2 (cum) 值评估模型的预测性能, 要求 R^2Y 和 Q^2 值均大于 0.5。提取潜在生物标志物的标准包括: ① t 检验组间 $P < 0.05$; ② VIP (variable importance in the projection) 为变量对模型的重要性, 描述了每一个

变量对模型的总体贡献, 设定 OPLS-DA 投影中的 VIP 阈值大于 1、折刀法 (Jack-knife) 不确定区间不跨越 0 点、S-plot 中的 P_{corr} 绝对值大于 0.58; ③ 组间倍数变化 (fold change) > 2 。

脂质 (鞘脂、磷脂和甘油酯) 和甾体激素的代谢通路分析通过公共网络数据平台 KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 和 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) 完成。

结果

1 肝脏油红 O 染色切片和大鼠体重

本研究将肝脏油红 O 染色切片作为评价双侧去卵巢大鼠模型和二仙汤效应的重要评价指标。结果如图 1 所示, 假手术组肝细胞内始终少见橘红色脂滴, 造模 4 周和 12 周后肝细胞内可见许多大小不一的橘红色脂滴, 且部分细胞内脂滴连接成片, 与假手术组比较具有明显差异, 显示造模成功。阳性对照药尼尔雌醇与模型组大鼠比较, 肝细胞油红 O 染色始终少见橘红色脂滴。给予二仙汤后肝细胞少见橘红色脂滴, 与模型组大鼠比较具有明显差异, 说明二仙汤与阳性药尼尔雌醇均可以显著改善双侧去卵巢引起的大鼠脂肪肝。体重结果表明, 与假手术组相比, 模型组大鼠在造模 4~12 周后体重显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 尼尔雌醇组在给药 2~12 周后体重显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组大鼠相比, 二仙汤组在给药 1 周后体重显著增加 ($P < 0.01$), 给药 3 周和 12 周后体重显著下降 ($P < 0.05$)。

2 二仙汤随调节脂代谢紊乱的潜在生物标志物和代谢通路代谢组学分析

对假手术组, 双侧去卵巢造模 2、4 和 12 周后大鼠组, 二仙汤给药组的血浆和肝脏组织分别进行了代谢组学分析, 为了更直观的描述脂质和甾体激素对不同组别的区分情况, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 区分假手术组、模型组和二仙汤组, 并绘制了得分散点图 (图 2), 质控 (quality control, QC) 样本为各组混合样本, 各代谢物峰面积相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 小于 15%。由图 3 可知, 无论在血浆还是肝组织中, 造模 2、4 和 12 周后假手术组, 模型组和二仙汤组均能得到很好的区分。

造模后 2、4 和 12 周, 大鼠血浆中共发现 46 个 (6 个甾体激素、3 个鞘酯、11 个甘油磷脂和 26 个甘油酯) 能同时表征脂代谢紊乱和二仙汤调节作用的潜在生物标志物 (图 3), 其中 34 个代谢物的浓度在给予二仙汤后发生回调。在 34 个回调代谢物中, 有 16 个代谢物在二仙汤的调节作用与模型脂代谢的紊乱中完全同步, 包括造模后 2 周发现的 Cer 26:0 和 Cer 20:0, 造模 4 周后

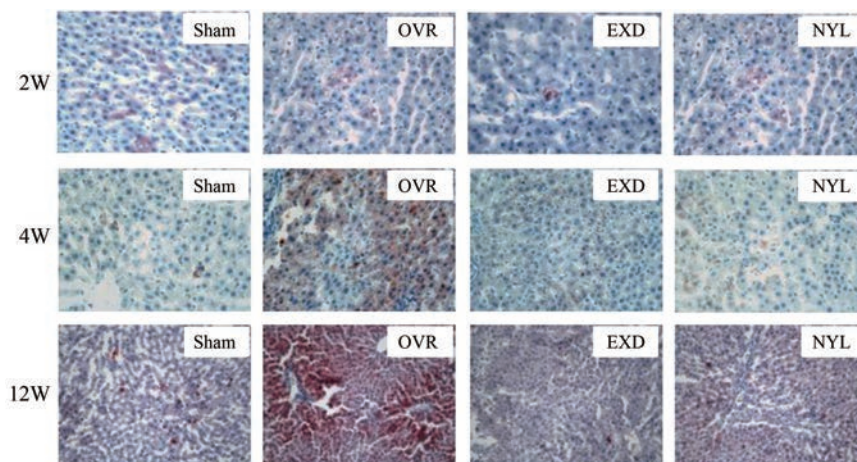


Figure 1 Oil red-O staining of liver tissues at 2 W, 4 W, and 12 W (magnification $\times 40$). Sham: Sham operation group; OVR: Bilateral ovariectomized model group; EXD: Er-xian Decoction group; NYL: Nilestriol group

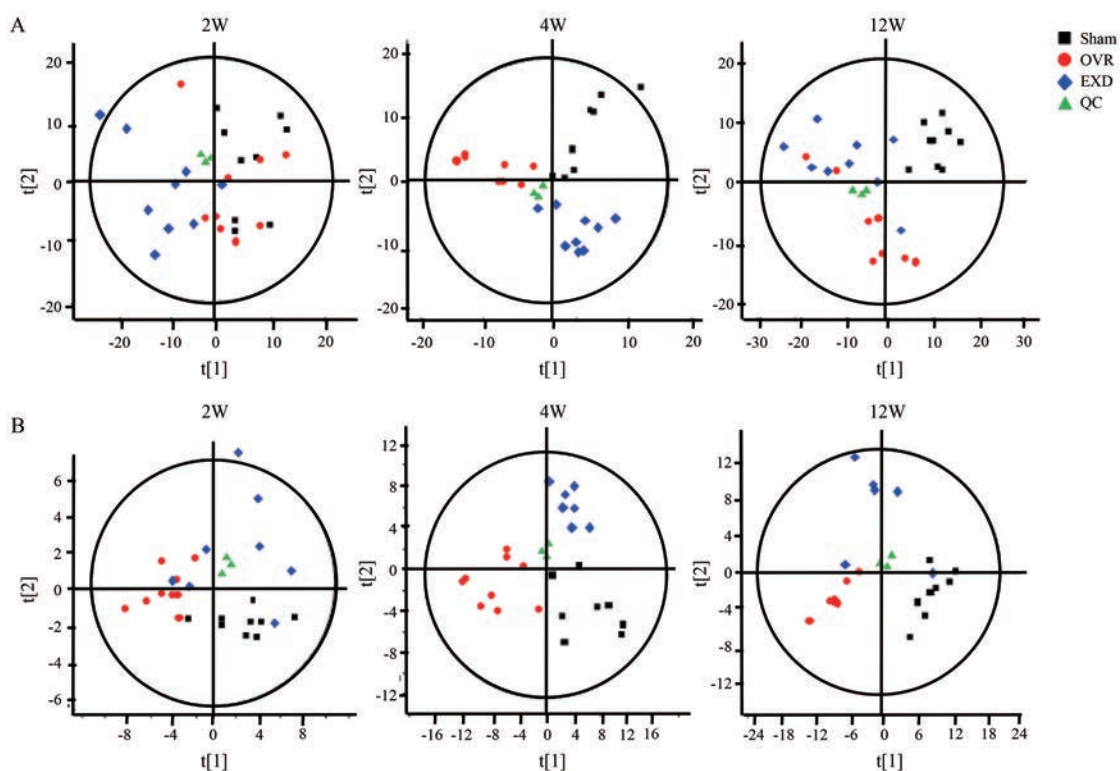


Figure 2 PCA of lipids and sex steroids at 2 week, 4 week, and 12 week in rat plasma (A) and liver (B). Each point represents a single plasma or liver sample from an individual animal, and is colored by the group

发现的 4-MeOE₂、LPC 22:5、PA 52O:0、PA 52P:0、PA 54O:0、PC 38:2、PC 43O:0、TG 50:1、TG 51:1、TG 51:3、TG 52:5、TG 51:5、TG 57:2 和 TG 58:1; 对于回调的代谢物 17-OHPROG 而言, 二仙汤的调节作用早于脂代谢发生紊乱; 其余回调的代谢物, 二仙汤的调节作用与部分脂代谢紊乱重叠。通路分析研究发现这 46 个代谢物广泛参与磷酸甘油酯的代谢、糖基磷脂酰肌醇和甾体激素的生物合成通路 (图 3)。

大鼠肝脏中共发现 32 个 (1 个甾体激素、20 个甘油磷脂和 11 个甘油酯) 能同时表征脂代谢紊乱和二仙汤调节作用的潜在生物标志物 (图 4)。这 32 个化合物的浓度均在给予二仙汤后发生回调, 其中的 16 个代谢物, 二仙汤的调节作用与更年期脂代谢紊乱完全同步, 包括造模后 2 周发现的 SM 24:2、TG 46:11 和 TG 60:4, 造模后 4 周发现的 PA 62:15、TG 53:4、TG 58:1 和 TG 58:8, 造模后 4 周和 12 周发现的 PC 40:9、PE 36:4、PE

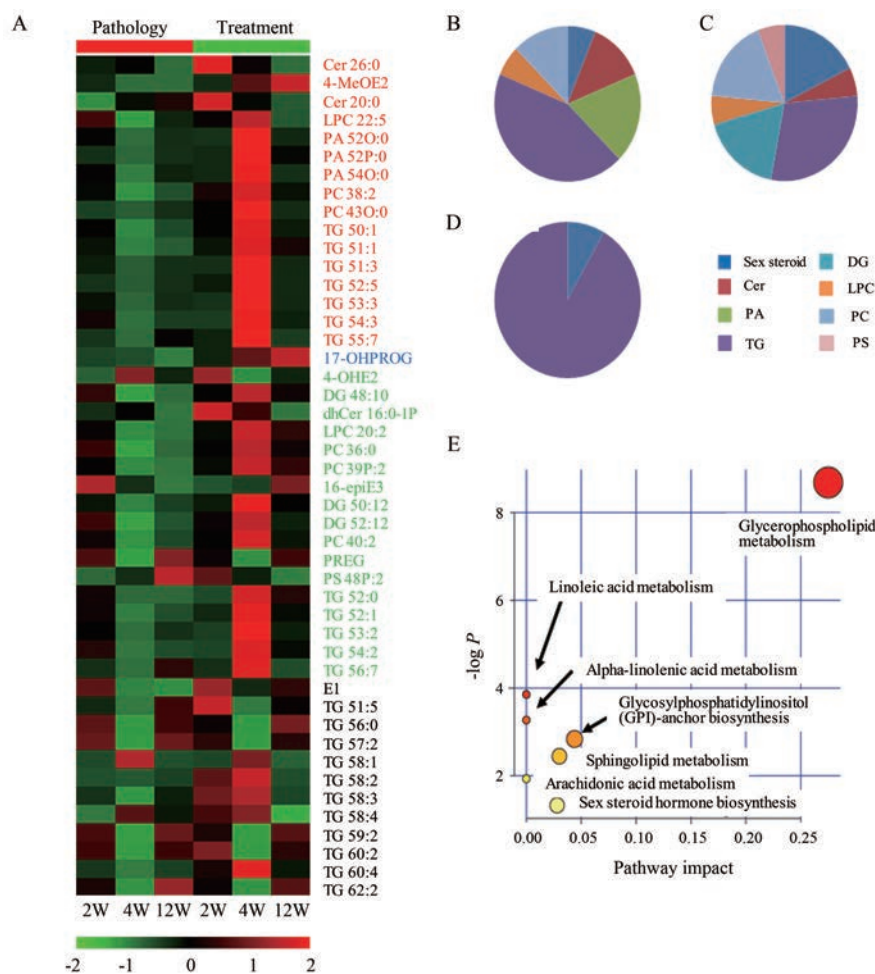


Figure 3 Er-xian Decoction regulates plasma lipid metabolism disorders over time. A: A heatmap of all plasma metabolite markers with significant difference for OVR pathology and EXD treatment ($n = 46$). Fold change at 2 W, 4 W, and 12 W are shown (Cer: Ceramide; dhCer: Dihydroceramide; 4-MeOE₂: 4-Methoxyestradiol; 4-OHE₂: 4-Hydroxyestradiol; 17-OHPROG: Hydroxyprogesterone; PREG: Pregnenolone; 16-epiE₃: 16-Epistriol; E₁: Estrone; LPC: Lyso-phosphatidylcholine; PA: Phosphatidic acid; PC: Phosphatidylcholine; PS: Phosphatidylserine; DG: Diglycerides; TG: Triglycerides); B-D: Composition of plasma metabolites of which the pathology is exactly the same as, partial overlapped, and not recovered; E: Pathway enrichment analysis

37:4、PI 36:5 和 PI 37:4, 造模后 12 周发现的 PE 34:2、PI 40:4、PS 20:4 和 SM 24:1; 其余 16 个代谢物, 二仙汤的调节作用与部分脂代谢紊乱重叠。通路分析研究发现这 32 个代谢物广泛参与磷酸甘油酯和甘油酯的代谢、糖基磷脂酰肌醇的合成通路(图 4)。构建了大鼠双侧去卵巢模型和二仙汤显著调节的脂质代谢网络见图 5。

讨论

更年期综合征是女性在绝经期前后(45~55岁), 由于卵巢功能逐渐衰退, 雌激素分泌过低, 引起下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴功能失调, 导致一系列以植物神经功能紊乱、代谢障碍为主的症候群。更年期妇女雌激素水平下降、卵巢功能衰退, 导致脂质代谢异常并

伴随肥胖、体重的增加和脂肪肝^[16-18]。双侧去卵巢大鼠模型可以较好地模拟女性绝经后体内低雌激素水平, 并且也会出现与人类似的体重增加和脂肪肝的症状, 因此本研究采用双侧去卵巢模型大鼠模拟更年期妇女的生理状态, 研究二仙汤对模型大鼠代谢紊乱的调节作用。肝脏油红 O 染色切片结果表明二仙汤具有良好的药效, 基于代谢组学分析平台对假手术组、模型组和二仙汤给药组血浆和肝脏样本进行分析, 统计分析组间显著性差异代谢物并找寻潜在生物标志物, 研究不同绝经阶段可能的病理变化和二仙汤调节更年期脂代谢紊乱的作用机制。无论是在血浆还是在肝脏中, 二仙汤对大部分潜在生物标志物的调节作用与随时间变化的脂代谢紊乱基本一致, 揭示二仙汤对双侧去卵巢模型引起的代谢紊乱具有实时调节的作用。除

去卵巢大鼠脂代谢紊乱和二仙汤对双侧去卵巢大鼠脂代谢紊乱调节作用的研究, 并从代谢组学的角度揭示了双侧去卵巢模型能引发机体的代谢紊乱, 同时还发现二仙汤能有效调节甾体激素和脂质代谢。造模后12周内进行动态的代谢组学分析有助于进一步了解脂质/甾体激素代谢紊乱和二仙汤调节作用的动态变化以及两者之间的关系, 从而有助于揭示二仙汤调节代谢紊乱的作用机制。

作者贡献: 生宁和王彩虹负责实验和数据分析, 完成文章撰写; 贾志鑫和王喆参与数据分析; 吴彩胜和张金兰负责指导实验思路; 所有作者均对本文有所贡献。

利益冲突: 无利益冲突。

Reference

- [1] Stachowiak G, Pertyński T, Pertyńska-Marczewska M. Metabolic disorders in menopause [J]. *Prz Menopauzalny*, 2015, 14: 59-64.
- [2] Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, et al. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: s1-s66.
- [3] Azizi H, Feng Liu Y, Du L, et al. Menopause-related symptoms: traditional Chinese medicine vs hormone therapy [J]. *Altern Ther Health Med*, 2011, 17: 48-53.
- [4] Wong KC, Lee KS, Luk HK, et al. Er-xian Decoction exerts estrogen-like osteoprotective effects in vivo and in vitro [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42: 409-426.
- [5] Liu S, Sun Y, Li J, et al. Preparation of herbal medicine: Er-xian Decoction and Er-xian-containing serum for *in vivo* and *in vitro* experiments [J]. *J Vis Exp*, 2017, 31: 55654.
- [6] Zhang Z, Xiang L, Zhao L, et al. The protective effect of Er-xian Decoction against myocardial injury in menopausal rat model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 245.
- [7] Chen HY, Cho WC, Sze SC, et al. Treatment of menopausal symptoms with Er-xian Decoction: a systematic review [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36: 233-244.
- [8] Wang XY, Zhang J, Li Y, et al. Research progress on the regulation of tumor metabolism, tumor immunotherapy and new analytical methods [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2080-2091.
- [9] Chen CC, Yin QC, Tian JS, et al. The mechanism of the anti-depression effect of the Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba herb pair determined by liver metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 941-949.
- [10] Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, et al. Metabolomics toward personalized medicine [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2019, 38: 221-238.
- [11] Xue L, Wang Y, Liu L, et al. A HNMR-based metabolomics study of postmenopausal osteoporosis and intervention effects of Er-xian Decoction in ovariectomized rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 7635-7651.
- [12] Paramsothy P, Harlow SD, Elliott MR, et al. Classifying menopause stage by menstrual calendars and annual interviews: need for improved questionnaires [J]. *Menopause*, 2013, 20: 727-735.
- [13] Wang C, Wu C, Zhang L, et al. Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for profiling ketolic and phenolic sex steroids using an automated injection program combined with diverter valve switch and step analysis [J]. *Anal Chem*, 2016, 88: 7878-7884.
- [14] Qu F, Wu CS, Hou JF, et al. Sphingolipids as new biomarkers for assessment of delayed-type hypersensitivity and response to triptolide [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52454.
- [15] Qu F, Zheng SJ, Wu CS, et al. Lipidomic profiling of plasma in patients with chronic hepatitis C infection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 555-564.
- [16] Mumusoglu S, Yildiz BO. Metabolic syndrome during menopause [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2019, 17: 595-603.
- [17] Xing X, Su L, Asare PF, et al. Danzhi Qing'e (DZQE) activates AMPK pathway and regulates lipid metabolism in a rat model of perimenopausal hyperlipidaemia [J]. *Exp Physiol*, 2016, 101: 1406-1417.
- [18] Izumi S, Muano T, Mori A, et al. Common carotid artery stiffness, cardiovascular function and lipid metabolism after menopause [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 1696-1701.