

葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 细胞糖代谢调控关系分析

陈瑶, 徐国良, 李冰涛, 姜丽, 盛译萱, 周子妍, 张启云*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探索葛根芩连汤含药血清对胰岛素抵抗(IR)的 HepG2 (IR-HepG2)细胞糖代谢的调控关系。方法:将正常的 HepG2 细胞作为空白组,IR-HepG2 细胞分为模型组,非诺贝特组,葛根芩连汤低、中、高剂量组,以葡萄糖消耗量为药效指标,采用色谱-质谱联用技术,对 IR-HepG2 细胞及给药后的 IR-HepG2 细胞内代谢产物进行分析,经过 Mass Profiler Professional(MPP)软件对数据进行分析,得出生物标志物,验证之后,研究呈剂量依赖的生物标志物对糖耗量的关系。结果:发现葛根芩连汤含药血清能提高 IR-HepG2 细胞的糖耗量,其调节机制可能和文中 6 个生物标记物有关,已确定其中 3 个生物标志物是存在剂量依赖性且对糖代谢具有调控作用。结论:葛根芩连汤含药血清可能通过调节 IR-HepG2 细胞色氨酸,泛酸和腺嘌呤的量达到提高糖代谢的作用。

[关键词] 葛根芩连汤含药血清; HepG2 细胞; 细胞代谢组学; 生物标志物; 调控关系

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R277.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0156-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180836

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1535.018.html>

[网络出版时间] 2018-01-25 9:27

Effect of Gegen Qinlian Tang Serum in Regulating Glucose Metabolism of IR-HepG2 Cells

CHEN Yao, XU Guo-liang, LI Bing-tao, JIANG Li, SHENG Yi-xuan, ZHOU Zi-yan, ZHANG Qi-yun*
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory effect of Gegen Qinlian Tang serum on the glucose metabolism of insulin resistance (IR) HepG2 (IR-HepG2). **Method:** Normal HepG2 cells were taken as blank control group. IR-HepG2 cells were divided into model group, fenofibrate group, low and high-dose Gegen Qinlian Tang group. With glucose consumption as the pharmacodynamic index, LC-MS was used for the analysis of metabolites of IR-HepG2 cells and IR-HepG2 cells. Mass Profiler Professional (MPP) software was used to analyze the data to obtain biomarkers; after validation, the relationship between glucose consumption and biomarkers was studied. **Result:** Three biomarkers were found to be dose dependent and could regulate glucose metabolism. **Conclusion:** Gegen Qinlian Tang-containing serum could regulate the content of tryptophan, pantothenic acid and adenine in IR-HepG2 cell to reduce sugar metabolism.

[Key words] Gegen Qinlian Tang serum; HepG2 cell; cell metabolomics; biomarker; regulatory relationship

细胞代谢组通常被定义为胞内和细胞膜小分子代谢物的集合,而代谢物参与胞内进程的多种变化,可鉴定生化反应的产物-内源性小分子物质,揭示一个活细胞中所运转的不同通路之间的联系^[1],并可反映和评价健康和病理机体之间的生化差异,为药物干预提供一个方向^[2];与其他方法比较,体外细

[收稿日期] 20171107(013)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403158,81560744);江西省卫生厅基金项目(2012A161);江西省教育厅基金项目(GJJ13586)
[第一作者] 陈瑶,硕士,从事代谢组学研究,E-mail:1020492822@qq.com
[通信作者] *张启云,博士,副教授,硕士生导师,从事中药代谢组学和药代动力学研究,E-mail:zhangqiyun0923@163.com

胞代谢组学表现出更多的优势,如实验变化易控制,高度重复性,低成本,结果更易解释等,且除肝细胞原代培养外,年龄、性别、种群控制等都不是主要影响因素^[3]。近年来,细胞代谢组学逐渐被认为是一种能够临床应用的有前景的技术,例如近期研究提出肿瘤组织弥漫性大 B 细胞的整个代谢概况有助于开发恶性肿瘤生物标志物新型疗法的研究,而以往的研究主要聚焦于小部分基因起源的特殊生物标签^[4-5],另外,给出的所有代谢物概况可能提供疾病危害如糖尿病、心脏病、癌症定量估计,并提供一种针对性的治疗策略^[6]。

2 型糖尿病 (T2DM) 属于严重影响人类生活质量的世界十大疾病之一,而胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 T2DM 的主要病理基础^[7],肝细胞糖代谢的紊乱对 IR 的发生具有十分重要的意义,因 HepG2 细胞具有类似于正常肝细胞的代谢功能,现被广泛用于筛选糖尿病药物及其分子机制研究^[8]。近年来,运用葛根芩连汤治疗 T2DM 的研究越来越多^[9-10],结果表明,葛根芩连汤治疗糖尿病疗效确切,且降糖作用明确,但其降糖机制尚不明确。因此本文以 HepG2 细胞为基础的代谢组学分析方法,研究葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 的糖代谢调节作用,在细胞水平上探讨葛根芩连汤对 T2DM 糖代谢的调控关系。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞系 HepG2 细胞 (北京鼎国生物科技有限公司,源于协和细胞库)。

1.2 试剂 葡萄糖测定试剂盒 (上海荣盛生物药业有限公司,批号 20160805122);DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司,批号 AC10202304);胰岛素,地塞米松 (美国 Sigma 公司,批号分别为 15500, 822A0528);青霉素/链霉素 (索莱宝科技有限公司,批号 20161222);0.25% 胰蛋白酶-EDTA (美国 Genview 公司,批号 721150101100);胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司,批号 20160420);非诺贝特 (中国食品药品检定研究院,批号 41DF-4HKJM);甲醇、乙腈 (HPLC 级,德国 Merck 公司,批号分别为 67-56-1, 75-05-8);甲酸 (色谱纯,美国 Dikma Pure 公司,批号 9287472)。

1.3 仪器 YDS-10 型液氮罐 (四川亚西橡塑机器有限公司);3111 型 CO₂ 培养箱,SPD131DDA-P1-230 型离心浓缩系统,SL 8R 型台式高速冷冻离心机 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司];CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);SW-UJ-2F 型双人双

面洁净工作台 (苏州净化有限公司);902 型 -80 ℃ 超低温冰箱,BCD_220UEMA6 型 -20 ℃ 低温冰箱 (海尔公司);LT-CPS 型自动高压灭菌器 (厦门致微有限公司);MaxPlus384 型全波长酶标仪 (美国 Spectra 公司);1290-G6538 型安捷伦超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS);ZORBAX Extend 型 C₁₈ 色谱柱 (美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备及质量控制 含药血清在前期研究中,由本课题组张启云副教授制备提供^[11]。大鼠灌胃给予 25 g·kg⁻¹ 的葛根芩连汤,每日 2 次,持续 5 d。最后 1 次灌胃前禁食不禁水 10 h,末次给药 1 h 后,心间取血,于 4 ℃ 冰箱中静置 1 h,离心 (3 500 r·min⁻¹, 15 min),分离血清于新的离心管中 (-80 ℃) 保存。取适量血清样品,经样品前处理后,采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用 (UPLC-MS-MS) 技术对各化合物进行多反应监测模式 (MRM) 检测。

2.2 HepG2 细胞的培养与 IR 模型的建立 参照文献 [12]。空白组 (10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基) 正常培养,模型组 (1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 胰岛素和 3.75 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 地塞米松的 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基) 诱导培养 48 h 后,弃培养液,以无血清的培养液培养 24 h,采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶 (GOD-POD) 法检测空白组与模型组的培养基上清液中葡萄糖含量,并计算葡萄糖消耗量,以两者之间的葡萄糖消耗量有显著性差异为模型诱导成功的标准。

2.3 IR-HepG2 细胞分组 模型诱导成功后,正常 HepG2 细胞为空白组 (15% 空白血清,5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养),IR-HepG2 细胞分成 6 组,分别为 IR 模型组 (15% 空白血清,1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 胰岛素和 3.75 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 地塞米松,5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养),非诺贝特组 (15% 空白血清,0.1 mmol·L⁻¹ 非诺贝特,1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 胰岛素和 3.75 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 地塞米松,5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养),葛根芩连汤低剂量组 (5% 含药血清 + 10% 空白血清,1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 胰岛素和 3.75 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 地塞米松,5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养),葛根芩连汤中剂量组 (10% 含药血清 + 5% 空白血清,1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 胰岛素和 3.75 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 地塞米松,5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养),葛根芩连汤高剂量组 (15% 含药血清,

$1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素和 $3.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松, 5% FBS 高糖 DMEM 培养基培养)。给药干预 17 h 后, 收集上清液, 检测葡萄糖含量, 并计算葡萄糖消耗量, 以给药组与模型组的葡萄糖消耗量有显著性差异作为药效作用的标准。

2.4 细胞样品制备 按照文献[13], 给药 17 h 后, 各组细胞用胰酶消化, 成细胞悬液, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 弃上清液, 将细胞迅速放入液氮中灭活, 反复冻融破裂细胞 2 次, 加入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 80% 甲醇-水溶液 1 mL, 涡旋 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液, 真空离心浓缩至管内无液滴, 15% 的甲醇-水复溶, 震荡 5 min, $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液, 进行样品分析。

2.5 色谱条件 安捷伦超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS); 色谱柱为 ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $3.5 \text{ }\mu\text{m}$), 流动相 A 水溶液 (0.1% 甲酸)-流动相 B (乙腈), 梯度洗脱, 0 ~ 5 min, 95% ~ 79% A, 5 ~ 6 min, 79% ~ 72% A, 6 ~ 17 min, 72% ~ 38% A, 17 ~ 20 min, 38% ~ 100% A, 20 ~ 21 min, 0% ~ 0% A, 21 ~ 22 min, 0% ~ 95% A, 22 ~ 26 min, 95% ~ 95% A; 进样 6 μL ; 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.6 质谱条件 正离子模式下对前处理的样品进行分析, 为保持仪器稳定性, 精密度和重复性, 使用仪器配套的参比液进行实时校正, 采用 Dual ESI 源, 正离子模式下 ($4\,000 \text{ V}$), 干燥气温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 精确适量扫描范围 50 ~ $1\,000 \text{ Da}$, 喷雾室压力 35 psig; 碎片电压 175 V; 锥孔电压 65 V。仪器使用参比自动校正, 参比液以 $5 \text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度通过自动传输入口, 参比离子 $m/z\,121.059\,73$ 和 $m/z\,922.097\,98$ 。

2.7 数据采集及数据处理 运用 UPLC-Q-TOF/MS 采集数据, 运用 Profinder B.06.0 对采集到的原始数据进行预处理 (背景扣除, 峰匹配, 峰对齐, 峰提取, 归一化处理和数据简单化), 得到化合物质荷比, 保留时间和峰面积的转换文件 (compound exchange file, CEF), 导入 Mass Profiler Professional (MPP) 软件, 采用主成分分析 (PCA), 进行条件筛选 Fold change > 2, 得出所有的代谢产物通过组间 t -test 检验, 其中 $P < 0.05$ 的代谢产物可能是生物标志物。在 MTLIN 数据库匹配化合物, 得到生物标志物名称或分子式。

2.8 生物标志物的验证与统计分析 筛选的标志

物化学结构在 UPLC-Q-TOF/MS 条件下的二级碎片特征与数据库 (METLIN, HMDB) 中进行比对并验证, 确定生物标志物。采用 SPSS 19.0 对这些生物标志物的峰面积值进行组间比较分析, 验证其是否有剂量依赖性。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据, 计量资料结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间的比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组之间采用非比较配对 t 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 血清质量数据控制 参见文献[11], 含药血清中 10 个有效成分的线性关系良好 ($r > 0.990\,0$), 日内精密度、日间精密度、稳定性的 RSD 值均 < 15%, 提取回收率、基质效应均符合方法学测定要求。

3.2 葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量影响 与空白组比较, 模型组的葡萄糖消耗量降低 ($P < 0.01$), 与模型组相比, 中浓度组的葡萄糖消耗量增高 ($P < 0.05$), 葛根芩连汤含药血清高浓度组的葡萄糖消耗量显著增高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Gegen Qinlian Tang serum (GQTS) on Glucose consumption in IR-HepG2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数	葡萄糖消耗量 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	—	10.71 ± 0.65
模型	—	$9.17 \pm 0.72^{1)}$
非诺贝特	0.1 ⁴⁾	$13.17 \pm 0.56^{3)}$
葛根芩连汤含药血清	5%	9.61 ± 0.54
	10%	$10.11 \pm 0.43^{2)}$
	15%	$10.53 \pm 0.51^{3)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾ 表示单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 生物标志物的验证 通过 UHPLC-TOF/MS 获得的精确相对分子质量来尝试确定生物标志物, 通过 MS/MS 试验, 对 $m/z\,136.061\,6$ 的生物标志物进行验证。在原始数据中提取特定离子 $m/z\,136.061\,6$, 得到响应的保留时间和色谱峰, 通过分子特征提取, 得到 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ 为 $136.061\,6$, 分子式 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$ 在 MassHunter 中得分值比较高, 在 MS/MS 图谱中有 $m/z\,119.036\,4$, $m/z\,92.024\,2$, $m/z\,67.027\,98$ 碎片离子, 发

现这与 HMDB, METLIN 数据库中的标准化化合物图谱具有很高的相似度, 综上, m/z 136. 061 6 被认为是腺

嘌呤。通过此方法, 鉴定其他生物标志物, 其中 2 个未鉴定出化合物名称。见表 2。

表 2 细胞中鉴定的生物标志物与未鉴定的生物标志物

Table 2 Biomarkers identified and biomarkers unidentified in cells

t/min	m/z	化合物	MS/MS	生物标记物	代谢通路
2. 38	136. 061 6	$\text{C}_5 \text{H}_5 \text{N}_5$	119. 04, 92. 04, 67. 03	腺嘌呤	purine metabolism
2. 02	188. 07	$\text{C}_{11} \text{H}_9 \text{N} \text{O}_2$	170. 06, 152. 05, 128. 05	吡啶丙烯酸	aminoacyl-tRNA biosynthesis
2. 03	205. 096 3	$\text{C}_{11} \text{H}_{12} \text{N}_2 \text{O}_2$	187. 08, 159. 09, 130. 07	色氨酸	tryptophan metabolism
1. 48	220. 117	$\text{C}_9 \text{H}_{17} \text{N} \text{O}_5$	202. 11, 184. 09, 88. 04	泛酸	pantothenate and CoA biosynthesis
0. 58	383. 109 9	$\text{C}_{19} \text{H}_{20} \text{O}_7$	—	—	—
0. 55	258. 106 3	$\text{C}_{10} \text{H}_{15} \text{N}_3 \text{O}_5$	—	—	—

3. 4 生物标志物的剂量依赖性 采用 SPSS 19. 0 中的“单因素方差分析”(One-way analysis of variance, ANOVA) 评估各组生物标志物的剂量依赖性, 结果表明, 与空白组比较, 模型组腺嘌呤的峰面积显著下降 ($P < 0. 01$), 色氨酸峰面积值下降 ($P < 0. 05$), 泛酸的峰面积显著升高 ($P < 0. 01$), 与模型组比较, 葛根芩连汤含药血清中体积分数组的腺嘌

呤的峰面积增高 ($P < 0. 05$), 泛酸的峰面积下降 ($P < 0. 05$), 葛根芩连汤含药血清高体积分数组的色氨酸的峰面积升高 ($P < 0. 05$), 腺嘌呤的峰面积显著升高 ($P < 0. 01$), 泛酸的峰面积显著下降 ($P < 0. 01$)。由以上结果发现, 色氨酸, 腺嘌呤, 泛酸均有剂量依赖性, 而其他化合物未见剂量依赖性。见表 3。

表 3 葛根芩连汤含药血清对生物标志物剂量依赖性对峰面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of GQTS on dose dependence of biomarkers ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\times 10^5$

生物标志物	体积分数/%	色氨酸	腺嘌呤	泛酸	吡啶西烯酸	$\text{C}_{19} \text{H}_{20} \text{O}_7$	$\text{C}_{10} \text{H}_{15} \text{N}_3 \text{O}_5$
空白	—	7. 63 $\pm$ 1. 99	1. 97 $\pm$ 0. 33	4. 79 $\pm$ 0. 85	19. 4 $\pm$ 5. 10	1. 54 $\pm$ 0. 98	7. 00 $\pm$ 4. 75
IR 模型	—	5. 38 $\pm$ 1. 08 ¹⁾	1. 11 $\pm$ 0. 63 ²⁾	6. 41 $\pm$ 1. 18 ²⁾	17. 9 $\pm$ 4. 20	1. 75 $\pm$ 0. 59	3. 07 $\pm$ 0. 634
葛根芩连汤	5	5. 90 $\pm$ 1. 51	1. 54 $\pm$ 0. 15	5. 27 $\pm$ 0. 88	15. 2 $\pm$ 4. 10	1. 25 $\pm$ 0. 67	7. 72 $\pm$ 4. 17
含药血清	10	6. 77 $\pm$ 1. 18	1. 72 $\pm$ 0. 20 ³⁾	4. 90 $\pm$ 0. 63 ³⁾	15. 2 $\pm$ 3. 20	16. 0 $\pm$ 3. 90	10. 2 $\pm$ 8. 20
	15	7. 86 $\pm$ 1. 51 ³⁾	1. 83 $\pm$ 0. 21 ⁴⁾	4. 52 $\pm$ 0. 57 ⁴⁾	14. 6 $\pm$ 1. 80	15. 7 $\pm$ 6. 30	4. 28 $\pm$ 2. 93

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0. 05$, ²⁾ $P < 0. 01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0. 05$, ⁴⁾ $P < 0. 01$ 。

4 讨论

基于剂量依赖性, 本文只对色氨酸, 泛酸和腺嘌呤这 3 种化合物进行了讨论, 但并不排除其他化合物对糖代谢有调节作用。

相关文献表明, 色氨酸 (tryptophan) 对血糖有调节作用^[14], 泛酸与 IR 有着密切关系^[16], 腺嘌呤可以调节葡萄糖的摄取^[18]。

Dayer 等^[14]的研究发现色氨酸对血糖有调节作用, 色氨酸代谢产物喹啉酸可抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性, 进而通过抑制糖尿病机体的糖异生作用降低糖尿病机体的血糖水平, 而 HUO 等^[15]研究表明, 二甲双胍通过提高糖尿病患者机体血清色氨酸表达水平来达到治疗效果, 表明了色氨酸与糖尿病密切相关。因此, IR-HepG2 细胞经过葛根芩连

汤含药血清干预, 细胞中的色氨酸水平提高。

LI 等^[16]研究发现泛酸 (pantothenic acid) 是辅酶 A (CoA) 合成中必不可少的物质, 因此泛酸对于碳水化合物, 蛋白质和脂肪的合成也是至关重要的。Reibel 等^[17]发现在糖尿病患者心脏中, 泛酸可能导致胰岛素水平降低和生成途径的激活; 而 Robishaw 等^[18]发现胰岛素是 CoA 生物合成的强抑制剂, 因此, 在 IR-HepG2 细胞中, 细胞内的泛酸含量较高, 经葛根芩连汤含药血清干预后, 泛酸在细胞中的含量水平降低。

研究表明^[19], 腺嘌呤 (adenine) 可以通过 AMP 激活的蛋白激酶介导信号转导调节葡萄糖摄取, 腺嘌呤表达水平增高时, 葡萄糖转运蛋白 4 的表达增强, 细胞对葡萄糖的摄取加强和细胞内的 ATP 水平

升高,这为治疗高血糖患者提供了策略;腺嘌呤在嘌呤代谢通路途径是必不可少的^[20]。因此在 IR-HepG2 细胞中,细胞内腺嘌呤表达水平较低,经葛根芩连汤含药血清干预后,腺嘌呤在细胞中的表达水平升高。

综上,葛根芩连汤含药血清对 IR-HepG2 细胞的糖耗量具有调节作用,葛根芩连汤含药血清通过回调细胞中色氨酸和腺嘌呤的含量,增加 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量;通过下调细胞中泛酸的含量,从而增加胰岛素含量,抑制 CoA 生物合成,增加 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量。因此推测葛根芩连汤对 T2DM 糖代谢的调节作用可能与色氨酸、腺嘌呤和泛酸有关,但其他生物标志物对 T2DM 糖代谢的调节作用有待进一步研究。

〔参考文献〕

[1] WANG T J, Larson M G, Vasan R S, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes [J]. Nat Med, 2011, 17 (4) : 448-453.

[2] WANG X, ZHANG A, HAN Y, et al. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease [J]. Mol Cell Pro, 2012, 11 (8) : 370-380.

[3] Cuperlovic-Culf M, Barnett D A, Culf A S, et al. Cell culture metabolomics: applications and future directions [J]. Drug Discov Today, 2010, 15 (15/16) : 610-621.

[4] Nielsen T H, Diaz Z, Christodouloupoulos R, et al. Methods for sample acquisition and processing of serial blood and tumor biopsies for multicenter diffuse large B-cell lymphoma clinical trials [J]. Cancer Epidem Biomark, 2014, 23 (12) : 2688-2693.

[5] Zanssen S, Schon E A. Mitochondrial DNA mutations in cancer [J]. PLoS Med, 2005, 2 (11) : e401.

[6] German J B, Hammock B D, Watkins S M. Metabolomics: building on acentray of biochemistry to guide human health [J]. Metabolomics, 2005, 1 (1) : 3-9.

[7] Saltiel A R, Kahn C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. Nature, 2001, 414 (6865) : 799-806.

[8] 方飞, 吴新荣, 罗明俐, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立及在筛选桑叶有效部位中的应用 [J]. 医药

导报, 2012, 31 (6) : 691-694.

[9] 潘竞锵, 韩超, 刘惠纯, 等. 葛根芩连汤降血糖作用的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9 (3) : 167-170.

[10] 王烨, 朱向东. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠 CRP, TNF- α , IL-6 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (21) : 130-134

[11] 彭国梅, 张启云, 李冰涛, 等. UPLC-MS/MS 同时测定葛根芩连汤含药血清 10 个有效成分的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27 (3) : 393-398.

[12] 黎宇, 徐国良, 罗新新, 等. 胰岛素和地塞米松联合诱导建立肝胰岛素抵抗细胞模型 [J]. 江西中医药, 2016, 47 (3) : 40-42.

[13] Dettmer K, Nürnberger N, Kaspar H, et al. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399 (3) : 1127-1139.

[14] Dayer M R, Safari I, Dayer M S. New evidence on hypoglycemic effect of quinolinic acid in diabetic rats [J]. Pak J Biol Sci, 2009, 12 (14) : 1025-1030.

[15] HUO T, CAI S, LU X, et al. Metabonomic study of biochemical changes in the serum of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of metformin hydrochloride [J]. J Pharm Bio Anal, 2009, 49 (4) : 976-982.

[16] LI L, HU Y F, WANG L, et al. Early hepatic insulin resistance in mice: a Metabolomics analysis [J]. Mol Endocrinol, 2010, 24 (3) : 657-666.

[17] Reibel D K, Wyse B W, Berkich D A, et al. Regulation of coenzyme A synthesis in heart muscle: effects of diabetes and fasting [J]. Am J Physiol, 1981, 240 (4) : H606-H611.

[18] Robishaw J D, Berkich D, Neely J R. Rate-limiting step and control of coenzyme A synthesis in cardiac muscle [J]. J Biol Chem, 1982, 257 (18) : 10967-10972.

[19] Young G H, LIN J T, CHENG Y F, et al. Identification of adenine modulating AMPK activation in NIH/3T3 cells by proteomic approach [J]. J Proteomics, 2015, doi: 10. 1016/j. jprot. 2015. 03. 012.

[20] 张静. 葛根芩连汤全方及组方治疗 2 型糖尿病大鼠尿液血液代谢组学的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014

〔责任编辑 全燕〕