

NMR 代谢组学研究大蒜辣素对大鼠的作用机制

王 丽¹, 宋 敏^{1,2*}, 杭太俊^{1*}, 张正行¹, 沈文斌³, 宋 喆³, 陈 坚⁴

(1. 中国药科大学药物分析室, 江苏 南京 210009; 2. 南京大学化学化工学院, 江苏 南京 210093;
3. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009; 4. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 核磁共振代谢组学研究大蒜辣素对大鼠的作用机制。以生物核磁共振技术结合偏最小二乘-判别分析法 (PLS-DA) 分析大鼠腹腔注射大蒜辣素后尿液内源性代谢产物的变化, 研究大蒜辣素对正常大鼠代谢过程的影响。给药后, 尿样中三羧酸循环中间产物柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸含量呈现出先升高后逐渐恢复的趋势, 酮体水平也有所上升; 而葡萄糖、乳酸、丙氨酸、马尿酸、氮氧三甲胺和牛磺酸水平略有降低。偏最小二乘分析表明, 给药组与对照组的代谢谱有明显差异。大蒜辣素给药后对正常大鼠代谢过程具有显著影响, 代谢组学研究有助于认识大蒜的作用机制。

关键词: 大蒜; 大蒜辣素; 代谢组学; 核磁共振

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 09-1019-06

Metabonomic study on the effects of allicin on rats

WANG Li¹, SONG Min^{1,2*}, HANG Tai-jun^{1*}, ZHANG Zheng-xing¹, SHEN Wen-bin³,
SONG Zhe³, CHEN Jian⁴

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 3. Center of Instrumental Analysis of China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 4. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: To investigate the effects of allicin on rats by NMR-based metabonomic method, the changes of endogenous metabolites in normal rat urine and the influences on metabolism were analyzed with bio-nuclear magnetic resonance (NMR) method and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) after intraperitoneal administration of allicin solution. The identified biochemical effects associated with allicin dosing included elevated then gradually recovered urinary levels of Krebs's cycle intermediates, such as citrate, α -ketoglutarate and succinate and increased concentrations of ketones. Meanwhile, decreased urinary concentrations of glucose, lactate, alanine, hippurate and trimethylamine oxide were observed. The PLS-DA revealed that the metabonomic profiles of allicin treated groups were obviously different from those of the control group. Allicin may change metabolism significantly in normal rats. The study of the pharmacologic mechanism of allicin by metabonomic method is practicable and it could be explored further.

Key words: garlic; allicin; metabonomics; NMR

代谢组学 (metabonomics) 方法, 由Nicholson等^[1]最先提出, 主要利用高分辨核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 或现代质谱技术, 对生物

体液的內源性代谢产物进行测定, 结合模式识别等数值分析方法, 分析探讨机体在各种状态下的代谢表型, 能够高通量、全景式、直观地研究生物体在生理、病理以及药物和毒物作用下发生的各种代谢动态变化, 从而有助于发现外源性物质作用的靶器官和靶点, 揭示其作用机制, 进而确定与之相关的生物标记物^[2]。

收稿日期: 2009-02-18.

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目 (200891124).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271090,

E-mail: cqsongmin@yahoo.cn; hangtj@cpu.edu.cn

大蒜 (*Allium sativum* L.) 是历史悠久的药食两用佳品, 具有杀菌、降血脂、抗血栓、预防中风和高血压、保护肝脏和提高机体免疫力、抗癌等多种药效^[3-6]。体内外研究表明, 其抗菌作用是由所含蒜氨酸在蒜酶作用下形成的大蒜辣素所产生^[7]。由于大蒜辣素稳定性差、半衰期短、反应活性高, 一直难以直接测定其药代动力学行为^[8]。本研究采用代谢组学手段, 通过 ^1H NMR 法测定大鼠腹腔注射大蒜辣素后尿液中内源性代谢物随时间的变化, 研究大蒜辣素对大鼠生物体内代谢的影响, 探讨大蒜辣素在大鼠体内的作用机制。

材料与方法

仪器 Bruker Avance-500 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 包括真空脱气泵、高压梯度泵、自动进样器、柱温箱和紫外检测器。

药品与试剂 新鲜大蒜 (市售, 徐州产); 羟苯乙酯购自中国药品生物制品检定所 (批号: 100847-200701, 纯度 99.9%); 重水, 氘代 3-三甲基甲硅烷基丙酸钠盐 (TSP) 购自 Sigma 公司; 水为自制纯净水; 其他试剂为分析纯。

实验动物 36 只雄性 SD 大鼠 [体重 (200 ± 20) g, 南京医科大学动物实验中心, 许可证号: SCXK (苏) 2002-0031] 置代谢笼中, 于室内保持 12 h 光照, 12 h 避光循环饲养, 给予标准饲料和饮用水, 且控制室内相对湿度 40% 左右, 试验前禁食 12 h。

大蒜辣素溶液的制备 大蒜经挑选、去皮、洗净后, 取约 500 g, 加 5 倍量水用捣碎机破碎呈匀浆, 35 °C 下温孵使酶解 2 h, 滤过, 收集滤液, 以 150 mL 二氯甲烷少量多次萃取, 合并提取液, 减压浓缩至干, 用 50 mL 生理盐水溶解, 滤过, 得大蒜辣素溶液, 4 °C 放置备用^[9]。采用羟苯乙酯为替代对照品, 高效液相色谱法^[10]测定滤液中主成分大蒜辣素的含量, 结果约为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

给药剂量的确定 参考文献^[11]报道大鼠每天口服大蒜辣素 $8 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其与依那普利降低血压、胰岛素和甘油三酯的水平相当, 并考虑到提取液中硫代亚磺酸酯类成分高剂量的刺激性可以引起大鼠出现竖毛、厌食、甚至死亡的现象, 经 $10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以大蒜辣素计) 不同剂量给予 8 只大鼠腹腔注射大蒜辣素提取液预试验考察, 最终确定每天给药剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

样本收集 28 只雄性 SD 大鼠随机分成 2 组, 给

药组按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以大蒜辣素计) 剂量, 每天早上 8:00 时腹腔注射大蒜辣素提取液, 连续给药 7 d; 对照组给予生理盐水。给药期间, 大鼠自由饮食、饮水。收集 1、3、5 和 7 d 24 h 的大鼠尿液。收集尿液 (置于冰水浴上并加 1% NaN_3 溶液 200 μL) 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 取上清液置 -80°C 冰箱保存备用。每天取给药组和对照组大鼠各 3 只, 收集尿后处死, 取肾和部分肝左叶组织经 10% 甲醛溶液固定, 常规取材, 脱水, 石蜡包埋, 制片 (4 μm), 采用常规 H&E 染色, 光学显微镜观察。

尿液的 NMR 测定 取尿样 0.5 mL 置离心管中, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7) 50 μL 及 D_2O 50 μL , D_2O 内含 TSP 作为化学位移内标, 最终 TSP 的浓度约为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 混合均匀, 于 4 °C 下静置 10 min, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液置 5 mm 样品管中进行 ^1H NMR 测定。采用预饱和的 ^1D -NOESY 脉冲序列, 检测谱宽为 8 kHz, 混合时间 0.15 s, 迟豫延迟时间 4 s, 自由感应衰减 (free induction decay, FID) 信号累加次数为 256 次, 采样点为 32 k。FID 信号经过傅里叶变换为一维 NMR 谱图。以 TSP 的甲基峰为化学位移对照, 并定为 $\delta 0$ 。

^1H NMR 数据的处理与分析 使用 AMIX 软件 (Bruker, version 3.6.8), 将大鼠尿液 ^1H NMR 图谱从 $\delta 0.5 \sim 9.5$ 按 $\delta 0.04$ 分段积分, 除去水峰以及因交叉弛豫引起峰形变宽的尿素峰所在化学位移区域 ($\delta 4.2 \sim 6.5$), 将所得的积分数据进行归一化处理, 并导入 SIMCA-P 12.0 软件包 (瑞典 Umetrics 公司), 采用偏最小二乘法-判别模式 (partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA) 分析数据。

结果

1 大鼠尿液 ^1H NMR 图谱的变化

尿液是易得的生物体液, 它含有通过肾小球滤过, 肾小管和集合管的重吸收及排泄产生的终末代谢产物。尿液的组成及其代谢物的浓度受机体各系统功能状态的直接影响, 可反映机体的代谢状况。因此, 尿液的变化不仅反映泌尿系统的疾病, 而且对全身系统的疾病诊断也有重要意义^[12-14]。

图 1 为大鼠对照组和大鼠腹腔注射大蒜辣素后尿液 ^1H NMR 谱的比较, 根据相关参考文献^[15-18]对化学位移进行归属, 得出变化明显的主要内源性代谢物为: 乳酸、 β -羟丁酸、丙氨酸、丙酮、琥珀酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、马尿酸、氮氧三甲胺 (TMAO)、牛磺酸、葡萄糖和马尿酸等。直观可以看出给药组和

对照组以及给药后不同时间所得 ¹H NMR 谱中某些代谢物峰有明显差别, 表明这些内源性代谢产物的含量发生了变化, 但是由于图谱的复杂性以及大鼠的个体差异等多种原因, 通过统计分析才能归纳出反映药物作用的整体结果。

2 大鼠尿液 ¹H NMR 图谱模式识别

对 ¹H NMR 谱变化影响最大的 2 个主成分 (PC) 值, 其贡献率均 >85%。由 2 个 PC 作图, 能很好地代表数据集所包含的生物化学变化。对照组与给药组全部大鼠尿液 ¹H NMR 谱波峰积分值 PLS-DA 分析的 score 图见图 2 (第 7 天给药组中有一数值出现在置信区间外, 被剔除)。从图 2 可见, 所有动物 PC 积分值集中分布于椭圆形散点图 (95% 的可信区间内) 的 4 个区域, 不同天数给药组与对照组间无明显交叉和重叠, 随着给药天数的增加, 所有点均大幅度偏离对照组; 到第 7 天代谢变化逐渐趋于稳定, 与第 5 天给药组略有交叉; 表明其代谢组是有差别的且逐渐达到平衡。

对给药组与对照组的 PC1 和 PC2 进一步分析, PLS-DA 的 loading 图见图 3, 可见大多数点集中在原点附近, 只有少数点远离原点, 正是这些点所代表的化合物造成了组间差异。对尿液的 ¹H NMR 谱主成分分析发现, 尿样中三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TAC) 中间产物柠檬酸、α-酮戊二酸、琥珀酸含量呈现出先升高后逐渐恢复的趋势, β-羟丁酸和丙酮等酮体水平也有所上升; 而葡萄糖、乳酸、丙氨酸、马尿酸、氮氧三甲胺和牛磺酸水平略有降低 (表 1)。

3 组织病理变化

对照组与给药组大鼠肾和肝组织病理检查结果如图 4 所示。肾小球细胞数未增多, 毛细血管腔无扩张, 肾小管上皮细胞无明显变性和坏死, 未见管型,

肾间质内无明显充血、水肿及炎细胞浸润。肝细胞排列呈索状, 肝细胞未见变性坏死, 肝窦无明显扩张, 肝小叶结构完整, 汇管区无炎细胞浸润及纤维结缔

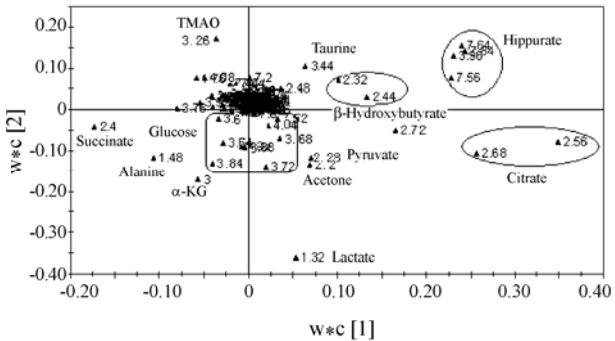


Figure 2 PLS-DA (partial least-squares disariminant analysis) score plots derived from ¹H NMR spectra of urine samples from control and experiment groups at different times after intraperitoneal administration of allicin solution

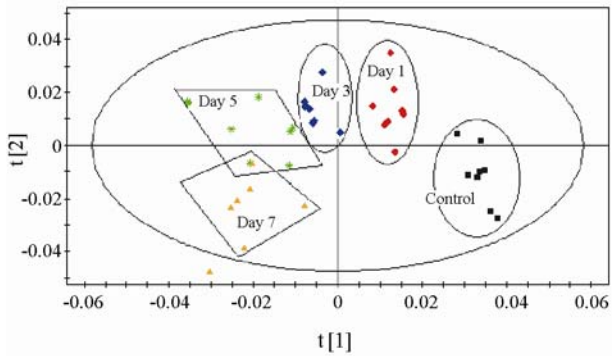


Figure 3 Loading plot derived from ¹H NMR spectra of urine samples from control and experiment groups at different times after intraperitoneal administration of allicin solution

Table 1 Changes of some metabolites in urine of rats after intraperitoneal administration of allicin solution

Metabolite	Chemical shift (δ)	Change / day			
		1	3	5	7
β-Hydroxybutyrate	4.16 (dt), 2.41 (dd), 1.20 (d)	↑	↑	↑	—
Lactate	4.11 (q), 1.32 (d)	↓	↓	↓	↓
Alanine	3.77 (q), 1.47 (d)	↓	↓	↓	↓
Acetone	2.22 (s)	—	—	↑	↑
Pyruvate	2.26 (s)	—	—	↑	↑
Succinate	2.39 (s)	↑	↑	↑	—
α-KG	2.45 (t), 3.01 (t)	↑	↑	↑	—
Citrate	2.55 (d), 2.70 (d)	↑	↑	—	—
TMAO	3.26 (s)	↓	↓	↓	↓
Glucose	3.42–3.70	↓	↓	↑	↑
Taurine	3.27 (t), 3.43 (t)	↓	↓	↓	↓
Hippurate	3.97 (d), 7.56 (t), 7.65 (t), 7.84 (d)	↓	↓	↓	↓

Note: “↓” decrease; “↑” increase; “—” no obvious change, compared to control; “s” single peak; “d” double peaks; “t” triple peaks; “q” quartet

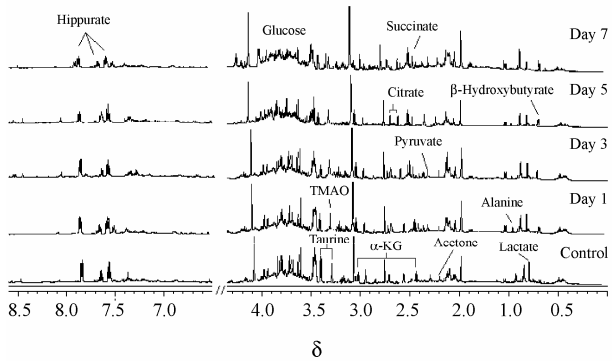


Figure 1 ¹H NMR spectra (δ 0–9.5) of rats urine samples from control and experiment groups at different times after intraperitoneal administration of allicin solution (10 mg·kg⁻¹, calculated as allicin)

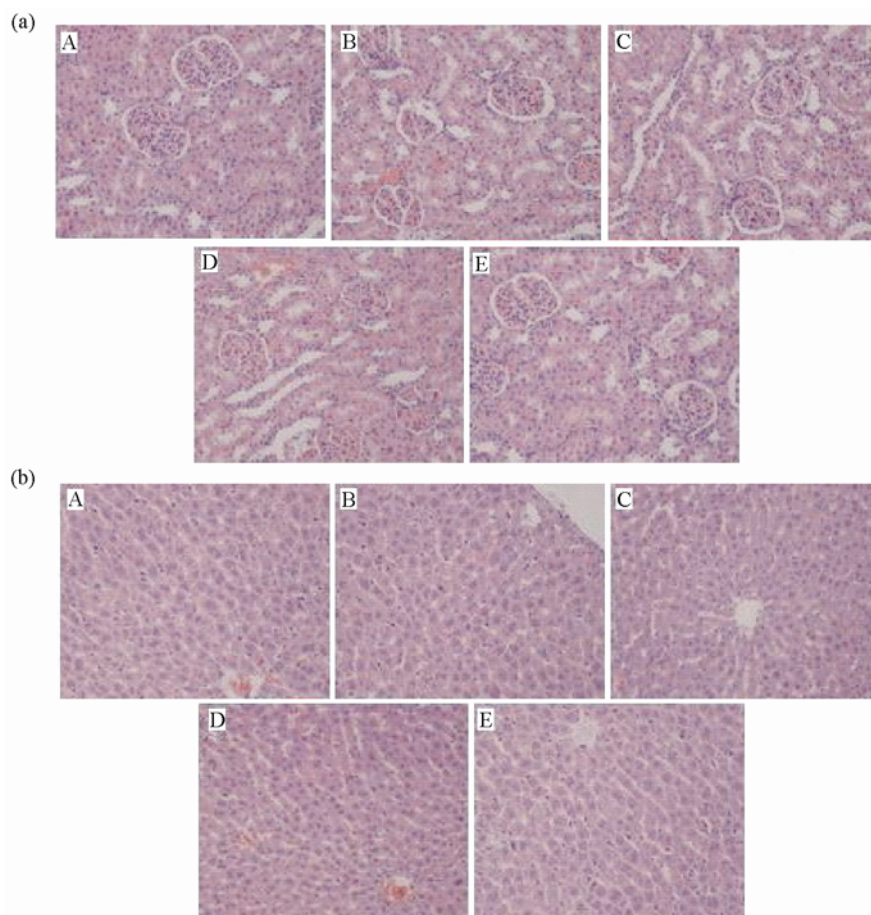


Figure 4 Microphotographs of kidney (a) and liver (b) tissues. A: Control group; B: Day 1 group; C: Day 3 group; D: Day 5 group; E: Day 7 group

组织增生。结果表明, 经给药处理后, 大鼠肾、肝器官均未出现明显的组织病理改变, 与对照组相比, 结果无明显差异。

讨论

尿液的一维 ^1H NMR 谱测得大量共振峰, 包括了数千种代谢物信息, 可以看作是代谢物成分的“精细”图谱。 ^1H NMR 谱峰与样品中各化合物中氢原子一一对应, 并在图谱中可能呈现相关谱峰, 图谱中各信号的相对强弱反映样品中相应组分的相对含量。按一定范围对谱图中的波峰进行分段、积分并归一化处理后的数据集代表了生物样品的代谢产物信息, 因此, ^1H NMR 方法适合于代谢组学研究。

数据分析过程中应用的技术集中在模式识别上, 应用最为广泛的是主成分分析法和偏最小二乘法。偏最小二乘回归是一种多元统计数据分析方法, 是多元线性回归、典型相关分析和主成分分析的集成和发展。它克服了自变量间的多重相关性, 既是一类模型式的方法, 又是一类认识性的方法, 在统计应用中起

着重要作用^[19]。偏最小二乘回归法和主成分分析相比, 对于模型的建立更具有合理性。主成分分析在提取主成分的过程中只考虑自变量集合中信息含量最大的几种主成分, 而忽略了对因变量集合的解释能力。但偏最小二乘法在提取主成分的过程中, 除了考虑所提取的成分对自变量有最大的解释能力外, 还考虑了对因变量的解释能力。本试验数据用 PCA 和 PLS-DA 的聚类结果一致。

^1H NMR 积分数据经 PLS-DA 分析后表明, 大蒜辣素经腹腔注射后大鼠不同时间的尿液代谢组成在 score 图中呈聚类分布。其中, 大鼠尿液葡萄糖和乳酸水平有所减少, 结合生糖氨基酸丙氨酸浓度升高, 表明大蒜辣素干预后大鼠体内碳水化合物的代谢发生了变化, 糖酵解、肝糖原分解及糖异生过程有所加强^[20]。同时, 尿液中柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸等三羧酸循环的中间产物含量减少以及丙酮酸含量增加, 提示三羧酸循环某些环节受到影响。因为丙酮酸是通过氧化脱羧生成乙酰 CoA 而进入三羧酸循环的, 生成的乙酰 CoA 又能激活丙酮酸脱氢酶复合体, 在

该酶的催化下,使丙酮酸进一步转化为乙酰 CoA,与草酰乙酸缩合,从而使生成的柠檬酸等三羧酸循环的中间产物增加。此外,乳酸水平的持续下降以及中间产物的含量逐渐恢复表明,大蒜辣素对于大鼠体内的糖异生有潜在的增强作用。

在丙氨酸-葡萄糖循环中,肌肉组织以丙酮酸作为转移的氨基受体,生成丙氨酸经血液运输到肝脏。在肝脏中,经转氨基作用生成丙酮酸,可经糖异生作用生成葡萄糖,葡萄糖由血液运输到肌肉组织中,分解代谢再产生丙酮酸,后者再接受氨基生成丙氨酸^[21]。尿液中丙氨酸和葡萄糖含量的一致性降低,表明给药后大蒜辣素对大鼠体内的丙氨酸-葡萄糖循环有下调作用。

β -羟丁酸,乙酰乙酸和丙酮三者统称为酮体,与脂肪代谢密切相关。大蒜辣素腹腔注射后大鼠尿液中 β -羟丁酸和丙酮含量有所增加,提示大蒜对脂肪代谢过程也产生了影响。结合三羧酸循环中一些中间产物浓度变化,本研究认为在大蒜辣素的作用下,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能,从而转向生成酮体^[18]。类似的,乙酰 CoA 也能在乙酰 CoA 水解酶 (ACH; EC 3.1.2.1) 的作用下被水解为醋酸,使得尿液中醋酸水平升高,这些都表明因能量代谢受到影响,使得生成酮体的能力增强。

氮氧三甲胺是由肠道菌将胆碱降解为三甲胺,继而氧化生成的^[22, 23];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^[24];另有文献^[25-27]报道当动物服用抗菌药物时,会改变尿中马尿酸和氮氧三甲胺的水平,故马尿酸和氮氧三甲胺的减少可以反映出大蒜辣素对肠道菌落的影响^[28, 29]。同时,氮氧三甲胺作为电子受体,其还原降解反应参与胞内呼吸链电子转移及能量保存过程^[30]。

大鼠给予大蒜辣素后,还发现牛磺酸排泄的减少。牛磺酸是胆汁酸盐的重要组成部分,后者参与脂肪的消化过程,它的减少说明脂肪代谢过程受到抑制。当然,任何化学物质的作用机制不是单方面的,是一个错综复杂的过程,但利用代谢组学技术至少能在机体代谢方面给出很好的提示。

组织病理学检查结果表明肾和肝未出现明显的组织病理改变,故给予大蒜辣素只是对大鼠生理过程产生影响。

代谢组学分析与常规检验不同,其能够较为全面地反映生物体在外界刺激影响下的代谢状态的改变,并能够通过某些代谢物含量的差异推断特定病

理生理状态下被调控的代谢途径^[31, 32],因而越来越广泛地应用于药物作用机制^[33]、药物毒性^[34]和疾病诊断^[35, 36]。但代谢组学分析也存在样品间变异、仪器动力学范围的局限、分析误差和当前有限的代谢组学数据库和数据交换版式等局限。但相信随着研究的进一步深入,代谢组学技术在药物作用机制、毒理机制信息和生物标志物研究中会有越来越重要的应用前景^[37, 38]。

References

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29: 1181-1189.
- [2] An DZ, Guo CJ. Metabonomics and nutriology [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 2007, 38: 277-279.
- [3] Heng RH, Ma HL. Recent progress in the research of active ingredient's abstraction from garlic [J]. *Food Technol* (食品科技), 2004, 10: 40-42.
- [4] Nursal G, Levent K, Ozer S. Long-term administration of aqueous garlic extract (AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 76: 2593-2606.
- [5] Bakri IM, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria [J]. *Arch Oral Biol*, 2005, 50: 645-651.
- [6] Varsha S, Christine B, Marie HS. Inhibition of carcinogen-induced DNA damage in rat liver and colon by garlic powders with varying alliin content [J]. *Nutr Cancer*, 2006, 55: 178-184.
- [7] Wu BG, Wu SX, Guo LR. The study of garlic and its application [J]. *China Med* (中国医药), 1981, 8: 7-10.
- [8] Gu YN, Huang YH. The study of the extraction of the active ingredient in garlic and its pharmacological action [J]. *J Nanjing Mil Med Coll* (南京军医学院学报), 2000, 22: 249-250.
- [9] Wang L, Song M, Hang TJ. HPLC tandem-mass spectrometric analysis of the chemical components and decomposition products in allicin extract of garlic [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2009, 44: 74-79.
- [10] Yuan YZ, Gu J, Hang TJ. A high performance liquid chromatography method for the determination of allicin using ethylparaben as substitute of allicin [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2008, 36: 1083-1088.
- [11] Bruck R, Aeed H, Brazovsky E, et al. The active component of garlic, prevents immune-mediated, concanavalin A-induced hepatic injury in mice [J]. *Liver Int*, 2005, 25: 613-621.
- [12] Gartland KP, Bonner FW, Nicholson JK. Investigations into

- the biochemical effects of region-specific nephrotoxins [J]. *Mol Pharmacol*, 1989, 35: 242–250.
- [13] Holmes E, Nicholson JK, Bonner FW. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition [J]. *NMR Biomed*, 1998, 11: 235–244.
- [14] Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC. Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine [J]. *Mol Pharmacol*, 1991, 39: 629–642.
- [15] Wilson ID, Nicholson JK. Solid phase extraction chromatography and NMR spectroscopy (SPEC-NMR) for the rapid identification of drug metabolites in urine [J]. *J Pharm Biomed*, 1988, 6: 151–165.
- [16] Gartland KPR, Eason CT, Wade KE. Proton NMR spectroscopy of bile for monitoring the excretion of endogenous and xenobiotic metabolites: application to para-aminophenol [J]. *J Pharm Biomed*, 1989, 7: 699–707.
- [17] Tulip K, Nicholson JK, Timbrell JA. A study of the metabolism of dimethylformamide in the rat by high resolution proton NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed*, 1989, 7: 499–505.
- [18] Wilson ID, Wade KE, Nicholson JK. Analysis of biological fluids by high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Trends Anal Chem*, 1989, 10: 368–374.
- [19] Yang YM, Liu ZW, Chen BQ, et al. Retrieval of oceanic color constituents from case II water reflectance by partial least squares regression [J]. *J Remote Sensing (遥感学报)*, 2005, 9: 123–130.
- [20] Zhang S, Gowda GA, Asiago V. Correlative and quantitative ^1H NMR-based metabolomics reveals specific metabolic pathway disturbances in diabetic rats [J]. *Anal Biochem*, 2008, 383: 76–80.
- [21] Felig P. The glucose-alanine cycle [J]. *Metabolism*, 1973, 22: 179–207.
- [22] Nicholls AW, Mortishire-Smith RJ, Nicholson JK. NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats [J]. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16: 1395–1404.
- [23] Delaney J, Neville WA, Swain A, et al. Phenylacetylglutamine, a putative biomarker of phospholipidosis: its origins and relevance to phospholipids accumulation using amiodarone treated rats as a model [J]. *Biomarkers*, 2004, 9: 271–290.
- [24] Phipps AN, Stewart J, Wright B, et al. Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28: 527–537.
- [25] Daykin CA, Van Duynhoven JP, Groenewegen A, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopic based studies of the metabolism of black tea polyphenols in humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 1428–1434.
- [26] Wang Y, Tang H, Nicholson JK, et al. A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 191–196.
- [27] Wei L, Liao PQ, Wu HF, et al. Toxicological effects of cinnabar in rats by NMR-based metabolic profiling of urine and serum [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 227: 417–429.
- [28] Baker JR, Chaykin S. The biosynthesis of trimethylamine-*N*-oxide [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1309–1313.
- [29] Smith JL, Wishnok JS, Deen WM. Metabolism and excretion of methlamines in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 125: 296–308.
- [30] Xu B, Zhao MY. Changes of metabonomic profiles of rat urine after oral administration of Radix Gentianae decoction [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2008, 22: 221–226.
- [31] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 471–478.
- [32] Holmes E, Nicholson JK, Tranter G. Metabonomic classification of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 182–191.
- [33] Coen M, Hong YS, Clayton TA. The mechanism of galactosamine toxicity revisited; A metabonomic study [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2711–2719.
- [34] Liao Y, Peng SQ, Yan XZ, et al. Metabonomics of isoniazid in rat's liver tissues [J]. *Chin New Drugs J (中国新药杂志)*, 2007, 16: 288–292.
- [35] Yang Y, Li C, Nie X. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2605–2614.
- [36] Yu K, Sheng G, Sheng J. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2413–2419.
- [37] Anthony ML, Sweatman BC, Beddell CR. Pattern recognition of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine [J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 46: 199–211.
- [38] Holmes E, Nicholson JK, Nicholls AW. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 1998, 44: 245–255.