

本文引用: 裴方好, 吴吉, 贺思雨, 雷倩, 赵莎, 张涤, 朱沁泉. 基于中医方证代谢组学研究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍肝肾不足证的物质基础[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(1): 51-61.

基于中医方证代谢组学研究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍肝肾不足证的物质基础

裴方好^{1,2}, 吴吉¹, 贺思雨¹, 雷倩¹, 赵莎³, 张涤¹, 朱沁泉^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 广东省深圳市龙岗区人民医院, 广东深圳 518000;

3. 联勤保障部队第九二二医院, 湖南衡阳 421002

【摘要】目的 采用中医方证代谢组学策略研究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍(ASD)肝肾不足证的药效物质基础。**方法** 采用孕期腹腔注射丙戊酸钠(VPA)法构建 ASD 大鼠模型, 将造模成功的仔鼠随机分为模型组($n=8$)与六味地黄丸组($n=8$), 另设空白组($n=8$)及空白给药组($n=5$)。每日上午, 六味地黄丸组与空白给药组灌胃六味地黄丸混悬液(3.4 g/kg), 模型组与空白组给予等量蒸馏水; 每日下午模型组与六味地黄丸组灌胃左甲状腺素钠(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 然后距尾尖约 2 cm 处夹尾 5 min 给予情志刺激, 以建立肝肾不足证候; 灌胃及夹尾均 1 次/d, 共计 14 d。给药结束后, 通过三箱社交实验评价仔鼠社交行为; HE、尼氏染色观察前额叶皮质组织病理学变化; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)结合多元统计分析鉴定差异代谢物, 并在 MetaboAnalyst 5.0 平台进行通路富集分析; UPLC-Q-TOF-MS 结合提取离子流(EIC)功能与质谱比对, 鉴定六味地黄丸的入脑成分; AutoDock Vina 软件对六味地黄丸入脑成分与差异代谢物关键酶进行分子对接。**结果** 三箱社交实验结果显示, 在社交能力阶段, 与空白组比较, 模型组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间更短($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间更长($P<0.05$)。在社交新颖性阶段, 与空白组比较, 模型组仔鼠与陌生鼠 2 社交时间更短($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠与陌生鼠 2 社交时间增加($P<0.05$)。HE 和尼氏染色结果显示, 与空白组比较, 模型组前额叶出现神经病理损伤; 与模型组比较, 六味地黄丸组前额叶神经病理损伤情况改善。代谢组学结果显示, ASD 肝肾不足证病理状态显著影响六味地黄丸的体内代谢过程; 多元统计分析共鉴定出 42 个差异代谢物, 其中嘌呤、2-(2-氨基乙基)吡啶、四癸胺、丁烯酰肉碱、鞘氨醇、吡哆醇(维生素 B₆)、 α -亚麻酸等为六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的关键差异代谢物, 涉及鞘脂代谢、维生素 B₆ 代谢、亚麻酸代谢、吡啶代谢通路。入脑成分分析结果显示, 共鉴定出 9 种六味地黄丸入脑成分, 包括甜菜碱、2-呋喃甲酸、腺苷、丹皮酚、萜萜宁、薯蓣皂苷、齐墩果酸、亚油酸、棕榈酸; 分子对接结果显示, 差异代谢物关键酶[包括腺苷酸琥珀酸裂解酶(ADSL)、5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成酶(PRPS)、脂肪酰胺水解酶(FAAH)、酰胺酶(Acy)、肉碱棕榈酰转移酶 1(CPT1)、鞘氨醇激酶 2(SphK2)、吡哆醇激酶(PDXK)、脂肪酸去饱和酶 2(FADS2)]与薯蓣皂苷、齐墩果酸结合能力最强, 其中 ADSL、Acy、CPT1、PDXK、FADS2 与薯蓣皂苷, CPT1、PDXK 与齐墩果酸结合能均小于 $-10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。**结论** 六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的作用机制可能与调节鞘脂代谢、维生素 B₆ 代谢、亚麻酸代谢、吡啶代谢通路相关, 其物质基础可能为甜菜碱、2-呋喃甲酸、腺苷、丹皮酚、萜萜宁、薯蓣皂苷、齐墩果酸、亚油酸、棕榈酸, 该实验为六味地黄丸制备工艺优化、质量标准建立及创新药物开发奠定了理论基础。

【关键词】 孤独症谱系障碍; 六味地黄丸; 肝肾不足证; 方证代谢组学; 分子对接

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.01.007

【收稿日期】2025-09-23

【基金项目】湖南省自然科学基金项目(2024JJ8233); 湖南省中医药科研计划项目(A2023036); 湖南省卫生健康高层次人才项目(20230448); 湖南中医药大学院校联合基金项目(2025XYLH038); 2024年湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202410541157)。

【通信作者】* 朱沁泉, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: 121088153@qq.com。

On the material basis of Liuwei Dihuang Pill in treating autism spectrum disorder with liver–kidney deficiency pattern based on TCM formula–pattern metabolomics

PEI Fangyu^{1,2}, WU Ji¹, HE Siyu¹, LEI Qian¹, ZHAO Sha³, ZHANG Di¹, ZHU Qinquan^{1*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Longgang District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 3. No. 922 Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Hengyang, Hunan 421002, China

[Abstract] Objective To investigate the pharmacodynamic material basis of Liuwei Dihuang Pill (LWDHP) on autism spectrum disorder (ASD) with liver–kidney deficiency pattern based on the strategy of TCM pattern–related metabolomics. **Methods** An ASD offspring rat model was established by intraperitoneal injection of sodium valproate (VPA) during pregnancy. Successfully modeled offspring rats were randomly divided into model group ($n=8$) and LWDHP group ($n=8$), with additional blank control group ($n=8$) and blank medication control group ($n=5$). Every morning, the LWDHP and the blank medication groups were gavaged with LWDHP suspension (3.4 g/kg), while the model and the blank control groups received an equal volume of distilled water. Every afternoon, the model and the LWDHP groups were gavaged with levothyroxine sodium (150 $\mu\text{g/kg}$), followed by a 5–minute tail clamp at approximately 2 cm from the tail tip as an emotional stimulation to establish a liver–kidney deficiency pattern. Both gavage and tail–clamp were performed once daily for 14 consecutive days. After treatment, the three–chamber social test was used to evaluate social behavior of offspring rats. HE staining and Nissl staining were performed to observe histopathological changes in the prefrontal cortex. Ultra performance liquid chromatography–quadrupole–time of flight–tandem mass spectrometry (UPLC–Q–TOF–MS) combined with multivariate statistical analysis was employed to identify differential metabolites, and pathway enrichment analysis was conducted using the MetaboAnalyst 5.0 platform. UPLC–Q–TOF–MS combined with the extracted ion chromatogram (EIC) function and mass spectrometry comparison was used to identify the brain–penetrating components of LWDHP. Molecular docking between the brain–penetrating components of LWDHP and key enzymes of differential metabolites was performed using AutoDock Vina software. **Results** The three–chamber social test results showed that in the sociability phase, compared with the blank control group, offspring rats in the model group spent significantly less time interacting with stranger rat one ($P<0.01$); compared with the model group, the LWDHP group spent more time interacting with stranger rat one ($P<0.05$). In the social novelty phase, compared with the blank control group, the model group spent significantly less time interacting with stranger rat two ($P<0.01$); compared with the model group, the LWDHP group spent more time interacting with stranger rat two ($P<0.05$). HE and Nissl staining results showed neuropathological damage in the prefrontal cortex of the model group compared with the blank control group, while this damage in the LWDHP group was alleviated compared to the model group. Metabolomic results indicated that the pathological state of ASD with liver–kidney deficiency pattern significantly affected the in vivo metabolic processes of LWDHP. Multivariate statistical analysis identified a total of 42 differential metabolites, among which purine, 2–(2–aminoethyl) pyridine, tetradecylamine, butenylcarnitine, sphingosine, pyridoxol (vitamin B₆), and α –linolenic acid were identified as key differential metabolites in the treatment of ASD with liver–kidney deficiency pattern by LWDHP, involving sphingolipid metabolism, vitamin B₆ metabolism, linolenic acid metabolism, and porphyrin metabolic pathways. Analysis of brain–penetrating components identified nine components of LWDHP, including betaine, 2–furoic acid, adenosine, paeonol, piperlonguminine, dioscin, oleanolic acid, linoleic acid, and palmitic acid. Molecular docking results showed that key enzymes of the differential metabolites including adenylosuccinate lyase (ADSL), phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (PRPS), fatty acid amide hydrolase (FAAH), amidase (Acy), carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), sphingosine kinase 2 (SphK2), pyridoxal kinase (PDXK), and fatty acid desaturase 2 (FADS2) exhibited the strongest binding energy with dioscin and oleanolic acid. The binding energy of ADSL, Acy, CPT1, PDXK, and FADS2 with dioscin, and of CPT1 and PDXK with oleanolic acid were all less than $-10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. **Conclusion** The mechanism of action of LWDHP on ASD with liver–kidney deficiency pattern may be related to the regulation of sphingolipid metabolism, vitamin B₆ metabolism, linolenic acid metabolism, and porphyrin metabolism pathways. Its material basis may involve betaine, 2–furoic acid, adenosine, paeonol, piperlonguminine, dioscin, oleanolic acid, linoleic acid, and palmitic acid. This study provides a theoretical foundation for optimizing the preparation process,

establishing quality standards, and developing innovative drugs for LWDHP.

〔**Keywords**〕 autism spectrum disorder; Liuwei Dihuang Pill; liver-kidney deficiency pattern; formula-pattern metabolomics; molecular docking

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是由遗传变异介导的神经发育障碍性疾病,起病于生命早期,表现为社交功能障碍、重复行为和兴趣受损^[1]。小儿肝肾不足证是指肝肾精血亏少,导致髓枯骨痿,元神失养而见发育迟缓、目无神采、骨骼萎软、寡言不语、智力低下、胆怯易惊、夜寐不安等症^[2]。中医学认为本病责之先天不足,禀赋异常^[3]。现代医学研究表明,本病发生归因于遗传变异与环境因素共同作用,例如父母高龄、多胎、环境污染、妊娠期接触化学药物等^[4]。湖南省中医药和中西医结合学会发布的《儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识》^[5]指出,ASD 肝肾不足证为临床常见病证之一,推荐使用六味地黄丸加减治疗。六味地黄丸由宋代儿科医家钱乙创制,记载于《小儿药证直诀·诸方》中,原方为契合小儿“纯阳”生理特点,化裁自《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治第六》八味肾气丸,去温热之肉桂、附子而成,具有滋补肝肾、填精养髓的功效。现代研究表明,六味地黄丸可有效治疗先天不足、禀赋亏虚所致肝肾不足型脑瘫等儿科疾病,以及年老久病、髓海空虚所致肝肾不足型阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病^[6-8]。目前,有关六味地黄丸治疗各类疾病肝肾不足证的临床疗效及安全性评价已见较多报道^[9-10],但其治疗 ASD 肝肾不足证的药效物质基础尚未阐明。中医方证代谢组学融合代谢组学与现代中药化学,旨在揭示中医证候的生物学内涵,构建方剂疗效的客观评价体系^[11]。该策略依托方剂有效性,系统鉴定中药活性成分,为中药质量标志物筛选与创新药物研发提供关键技术支撑,已成为推动中药现代化的重要研究方法^[12]。本课题组前期已证实,六味地黄丸能够通过脑源性神经营养因子、糖原合成酶激酶 3 β 等通路改善 ASD 大鼠的异常行为学表现以及神经元病变,发挥神经保护作用^[13-14],但对 ASD 肝肾不足证的防治机制尚不明确。故本研究首次基于中医方证代谢组学策略,鉴定与 ASD 肝肾不足证相关的脑组织生物标志物;通过小分子代谢物评价六味地黄丸的治疗作用。进一步结合中药成分分析,明确显效状态下六味地黄丸的人脑成分,并采用分子对接技术预测其与关键酶的结合模式,以揭示六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的药效物质基础。

1 材料

1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 SD 孕鼠 7 只,体质量为(310 \pm 35) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004;饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心。本实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,实验动物伦理号:ZYFY202409050。

1.2 主要试剂

丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)粉剂(美国 Sigma 公司,批号:P4543);六味地黄丸(九芝堂股份有限公司,国药准字:Z43020145,规格:200 丸/瓶,批号:202308130);二甲苯(\geq 99%,分析纯)(上海阿拉丁科技生化股份有限公司,批号:X112051);无水乙醇(\geq 99.7%,分析纯)、甲酚紫(BS Grade 生化级)(国药集团化学试剂有限公司,批号:10009218、71044080);冰醋酸(\geq 99.5%,分析纯)(天津科密欧化学试剂有限公司,批号:FX11610);4%多聚甲醛(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL539A);ESI-L 低浓度调谐混合物(美国 Agilent 科技公司,批号:G1969-85000)。

1.3 主要仪器

三箱社交行为箱、LabmazeV3.0 动物行为轨迹分析系统(北京众实迪科技发展有限公司,型号:ZS-SXJ-II、1056000-2);石蜡切片机(德国徕卡仪器有限公司,型号:RM2235);显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX53);色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 科技公司,型号:1290UPLC-6540 QTOF)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

按 SCHNEIDER 等^[15]的方法建立 ASD 模型,具体如下:将 7 只孕鼠分为 VPA 组(5 只)和空白组(2 只)。VPA 组单次腹腔注射 600 mg/kg VPA 溶液(浓度为 250 mg/mL,配制方法为 1 g VPA 粉剂+4 mL 生理盐水),空白组注射等体积生理盐水。两组孕鼠所生仔鼠仍分别记为 VPA 组和空白组,在雄性仔鼠第 21 天时,通过行为学进行模型评价,以仔鼠表现出社交能力障碍或社交新颖性障碍为造模成功标

准^[13]。从符合 ASD 模型的雄性仔鼠中筛选 16 只,根据随机数字表法均分为模型组($n=8$)和六味地黄丸组($n=8$)。另取空白雄性仔鼠 13 只,同法随机分为空白组($n=8$)和空白给药组($n=5$)。根据前期预实验以及文献研究^[16],六味地黄丸灌胃剂量为 3.4 g/kg(浓度为 0.34 g/mL,配制方法为:0.34 g 六味地黄丸粉末+1 mL 蒸馏水,按 10 mL/kg 体积灌胃);每日上午,六味地黄丸组与空白给药组灌胃六味地黄丸混悬液,模型组与空白组给予等量蒸馏水;此外,每日下午模型组与六味地黄丸组灌胃左甲状腺素钠(150 μ g/kg),然后距尾尖约 2 cm 处夹尾 5 min 给予情志刺激,以建立肝肾不足证候^[17];灌胃及夹尾均 1 次/d,共计 14 d。

2.2 行为学评价

三箱社交实验用于评估仔鼠的社交行为^[18],分 3 个阶段,具体如下。(1)适应阶段:将待测仔鼠放入行为箱中央室,开放两侧小门,充分适应环境 10 min;(2)社交能力阶段:仔鼠重新放至中央区域,关闭两侧小门,并在一侧束缚器中随机放入一只同种属、同性别、同年龄段的陌生鼠 1,另一侧束缚器则保持空置,随后打开小门,记录其在 10 min 内的社交行为表现;(3)社交新颖性阶段:社交能力测试结束后,将仔鼠重新放至中央区域,关闭小门,陌生鼠 1 仍保持在束缚器中,另一侧空置束缚器则放入一只陌生的同种属、同性别、同年龄段的陌生鼠 2,再次打开小门,记录其在 10 min 内的社交行为表现。

2.3 组织病理学检测

仔鼠麻醉后,经左心室灌注生理盐水与 4%多聚甲醛进行全身灌注固定。迅速取出前额叶皮质组织,置于相同的 4%多聚甲醛中,固定 24 h。随后,将组织块经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。使用石蜡切片机进行连续冠状切片,厚度为 5 μ m。将切片置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 1 h 以增强附着力。随后进行常规脱蜡至水,二甲苯 I、II 各 15 min,梯度乙醇(95%、85%、75%)各 5 min,最后用蒸馏水冲洗。HE 染色:切片经苏木精染液染色 5 min,流水冲洗后,用 1%盐酸乙醇分化数秒,再次流水返蓝 15 min;随后,用伊红染液复染 3 min。尼氏染色:切片在预热至 50 $^{\circ}$ C 的 0.5%甲酚紫染液中染色 10 min;随后,用蒸馏水快速漂洗,并在 70%乙醇中进行分色,分色过程持续至显微镜下背景清晰、神经元尼氏体显色分明为止。所有染色后的切片均经梯度乙醇(75%、85%、95%)脱水、二甲苯透明,最后用中性树胶封固。使用光学显微镜观察切片。

2.4 代谢组学分析

末次给药 1 h 后,采用戊巴比妥钠对仔鼠进行麻醉,腹主动脉取血,离心 10 min,收集仔鼠血清样本。取 2 mL 血清,按 1:3 比例加入甲醇,混匀后涡旋振荡 5 min,离心 10 min 以沉淀蛋白,取上清液,使用离心浓缩仪将溶剂挥干,取 200 μ L 甲醇将残渣复溶,离心 5 min 取上清液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,将过滤后的液体置于进样瓶中,等待检测。

色谱条件:色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m),流动相由有机相乙腈(A)和水相(B)组成,其中水相 B 中含 0.05 mmol/L 甲酸(质谱级),设置梯度洗脱程序:0~10 min,5%~15% A;10~20 min,15%~35% A;20~30 min,35%~55% A;30~40 min,55%~85% A;40~50 min,85%~95% A;流速:0.4 mL/min,进样量:2 μ L。

质谱检测条件:采用正负离子分析模式,离子化方式为电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI),进样分析前采用 ESI-L 低浓度调谐混合物进行准确质量数的校正。一级质谱扫描检测范围:m/z 100~1 700,采用氮气为除溶剂干燥气体,温度为 325 $^{\circ}$ C,流速为 6.8 L/min,鞘气温度为 350 $^{\circ}$ C,毛细管电压为 4.0 kV,Fragment 电压为 150 V。

采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)代谢组学技术鉴定证候相关生物标志物。原始质谱数据先经 Waters Progenesis QI 2.0 校正质控样,完成峰提取、对齐、去卷积及总离子强度归一化;随后在 Ezinfo 2.0 中进行多元统计分析。先用主成分分析(principal components analysis, PCA)观察整体聚类,再采用有监督的偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)进行模式识别与组间区分,系统表征组间代谢轮廓差异;再用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)结合 S-plot 图筛选差异代谢物,以 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 为标准,并以 R^2Y 、 Q^2 (接近 1 为佳)及置换检验(Q^2 截距 <0.05)评估模型可靠性;候选离子通过 MS/MS 碎片比对 Chemspider、METLIN、mzCloud、HMDB 与 KEGG 完成鉴定,最终在 MetaboAnalyst 5.0 平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>)中进行通路富集分析。

2.5 入脑成分分析

将麻醉后的大鼠断头,迅速开颅取出脑组织,精密称取其重量,然后将脑组织剪碎,按 1:5 的比例加入甲醇,研磨匀浆 3 min,并涡旋混匀 3 min,超声提

取 3 min, 离心 10 min 后取上清液, 用离心浓缩仪挥干溶剂, 残渣用 200 μ L 甲醇复溶, 离心后取上清液, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 等待分析。

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 分析在显效状态下六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的潜在入脑成分。数据采集使用 Agilent MassHunter 软件 (B.07.00 版) 在正、负离子模式下进行, 涵盖模型组脑组织、模型组脑组织加对照品及六味地黄丸组脑组织样本。数据处理依托 Agilent Masshunter Qualitative Analysis 工作站的提取离子流 (extracted ion chromatogram, EIC) 功能, 通过以下系统流程实现成分筛选与鉴定: 首先提取模型组脑组织的分子特征作为内源性本底轮廓; 继而提取六味地黄丸组脑组织特征, 并通过比对筛选出在给药组中特异性存在或丰度显著提升的特征离子; 最终, 结合对照品的保留时间、质谱信息、前期建立的体外成分数据库、二级质谱裂解规律及文献报道的分子式等多维度信息, 对潜在入脑成分进行精准鉴定与归属。

2.6 分子对接

利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得入脑成分 3D 结构的 SDF 格式文件, 利用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得差异代谢物关键酶 3D 结构的 PDB 格式文件; 利用 AutoDock Vina 软件将成分与靶点结合, 并基于结合能通过 Protein-Ligand Interaction Profiler (<http://plip.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 在线分析工具和 PyMOL 3.1.1 软件进行可视化分析, R 语言绘制热图。

2.7 统计学方法

运用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析并绘制统计图。若数据符合正态分布, 计量资料采用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析, 不符合正态分布的数据使用 *M*(*P*₂₅, *P*₇₅) 表示, 采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 六味地黄丸改善 ASD 肝肾不足证模型仔鼠的社交行为缺陷

在社交能力阶段, 与空白组比较, 模型组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间更短 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间更长 (*P* < 0.05)。在社交新颖性阶段, 与空白组比较, 模型组仔鼠与陌生鼠 2 社交时间更短 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠与陌生鼠 2 社交时间更长 (*P* < 0.05)。详见图 1、表 1。

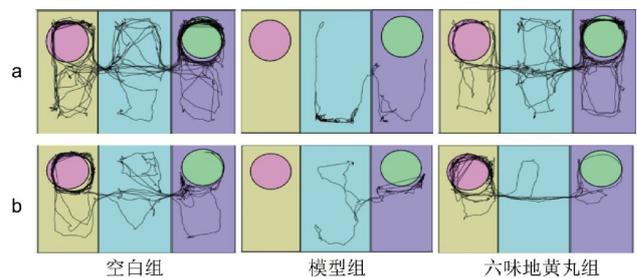


图 1 各组仔鼠三箱社交行为轨迹图

Fig.1 Social behavior trajectory diagram of offspring rats in different groups

注: a. 社交能力阶段; b. 社交新颖性阶段。紫色矩形为陌生鼠 1 室, 绿色圆形为陌生鼠 1; 蓝色矩形为中央室; 黄色矩形在社交能力阶段为物体室, 在社交新颖性阶段为陌生鼠 2 室。粉色圆形在社交能力阶段为物体, 在社交新颖性阶段为陌生鼠 2。

3.2 六味地黄丸缓解 ASD 肝肾不足证模型仔鼠前额叶皮质组织病理损伤

HE 染色中, 与空白组比较, 模型组仔鼠可见大量的神经元变形, 细胞核皱缩、深染, 排列不整齐, 组织水肿疏松; 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠神经元变形改善, 可见少量的神经元变形, 未见明显的神经元坏死及其他明显异常。在尼氏染色中, 与空白组比较, 模型组仔鼠脑组织结构重度异常, 神经元结构严重受损, 可见大量神经元细胞核固缩, 细胞质内的尼氏小体几乎完全消失; 与模型组比较, 六味地黄丸组仔鼠脑组织结构轻度异常, 神经元数量增加,

表 1 各组仔鼠社交时间比较 [*M*(*P*₂₅, *P*₇₅), *n*=8]

Table 1 Comparison of social interaction time of offspring rats in different groups [*M*(*P*₂₅, *P*₇₅), *n*=8]

组别	社交能力阶段		社交新颖性阶段	
	物体/s	陌生鼠 1/s	物体/s	陌生鼠 2/s
空白组	16.66(2.56, 28.37)	215.44(106.71, 283.04)	25.02(11.69, 38.46)	123.75(69.91, 165.10)
模型组	2.42(0, 8.81)	0.16(0, 2.10)**	11.45(1.07, 80.10)	0.16(0, 4.19)**
六味地黄丸组	11.13(0, 39.12)	76.78(65.91, 107.47)#	90(5.87, 15.93)	56.34(44.08, 68.72)#

注: 与空白组比较, ***P* < 0.01; 与模型组比较, #*P* < 0.05。

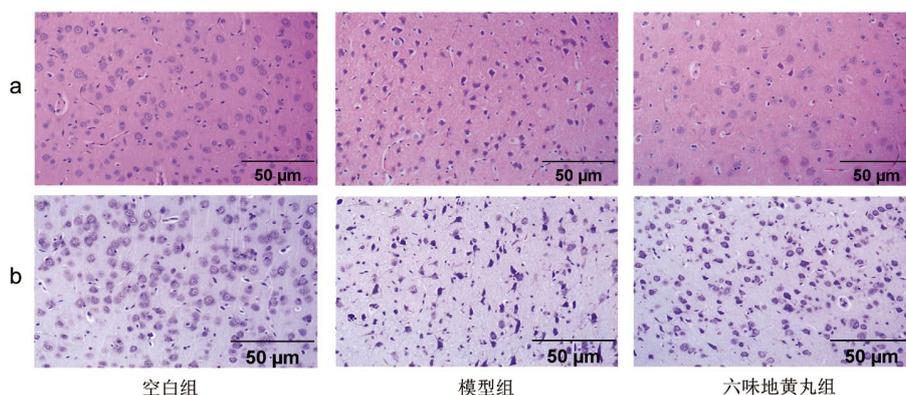


图 2 各组仔鼠前额叶皮质组织病理学观察($\times 200$)

Fig.2 Histopathological observation of prefrontal cortex tissue of offspring rats in different groups ($\times 200$)

注:a.HE染色;b.尼氏染色。

神经元少量变性,少部分神经元细胞核固缩,尼氏小体数量增多。详见图 2。

3.3 ASD 肝肾不足证病理状态对六味地黄丸体内代谢过程的影响

通过比较空白给药组与六味地黄丸组的血清代谢轮廓,探究 ASD 肝肾不足证病理状态对六味地黄丸体内代谢过程的影响,分析由疾病模型所引起的药物代谢谱的特异性变化。采用 PCA 对上述两组样本进行比较。PCA 得分图显示,空白给药组与六味地黄丸组的样本点呈现出明显的分离趋势,且组内样本聚集良好。这一结果表明,在给予相同六味地黄丸干预的前提下,ASD 肝肾不足证病理状态显著改变了大鼠体内的整体代谢响应谱,提示该病理状态深刻影响了六味地黄丸在体内的吸收、分布、代谢或排泄过程。详见图 3。

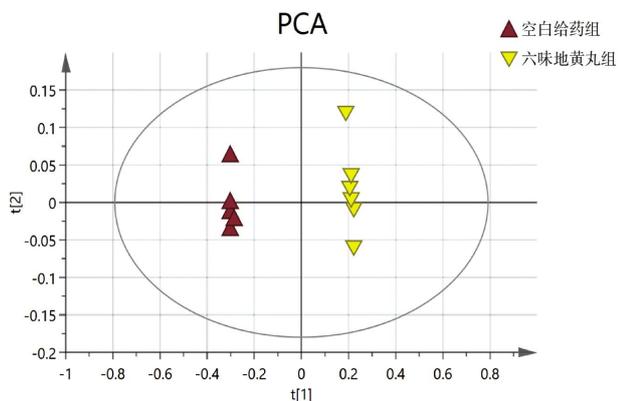


图 3 两组仔鼠血清 PCA 图

Fig.3 PCA diagram of serum of offspring rats in two groups

3.4 多元统计分析鉴定差异代谢物与代谢通路分析

首先采用 PLS-DA 表征空白给药组和六味地黄丸组之间的差异。PLS-DA 得分图显示,两组样本分

别聚集在一起,并且彼此之间明显分离, $R^2X > 0.5$ 、 $R^2Y > 0.5$ 、 $Q^2 > 0.5$,表明此模型没有过拟合现象。详见图 4。

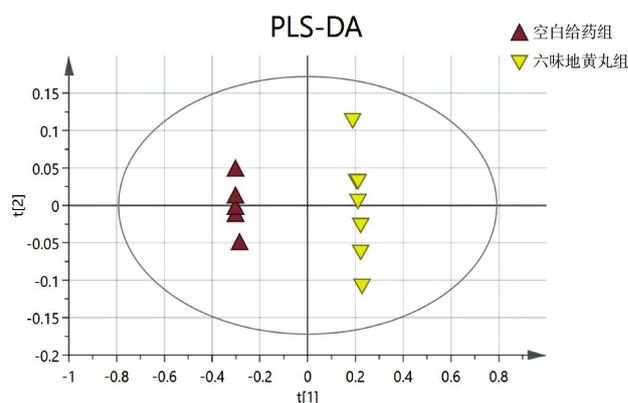


图 4 两组仔鼠血清 PLS-DA 得分图

Fig.4 PLS-DA score diagram of serum of offspring rats in two groups

为进一步降低模型复杂度并最大化组间差异,在 PLS-DA 分析的基础上构建 OPLS-DA 模型,OPLS-DA 得分图显示,两组样本各自聚类且完全分离,表明六味地黄丸干预显著逆转了 ASD 肝肾不足证模型的代谢紊乱;为验证 OPLS-DA 模型的可靠性并避免过拟合,进行随机置换检验,结果表明,所有随机置换模型的 R^2 和 Q^2 值均显著低于原始模型,且 Q^2 回归线与 Y 轴的截距为负,证明所建模型稳健可靠,可用于后续生物标志物的筛选;基于此,以 S-plot 图初筛,并联合 $VIP > 1.0$ 和 $P < 0.05$ 的双重标准,最终确定差异代谢物。详见图 5。通过火山图进行可视化,结果显示,两组间共存在 331 个差异代谢物,其中上调 254 个、下调 77 个。详见图 6。

将上述筛选得到的质谱信息与 HMDB 等数据库进行比对,最终在正离子模式下成功鉴定出 42 个

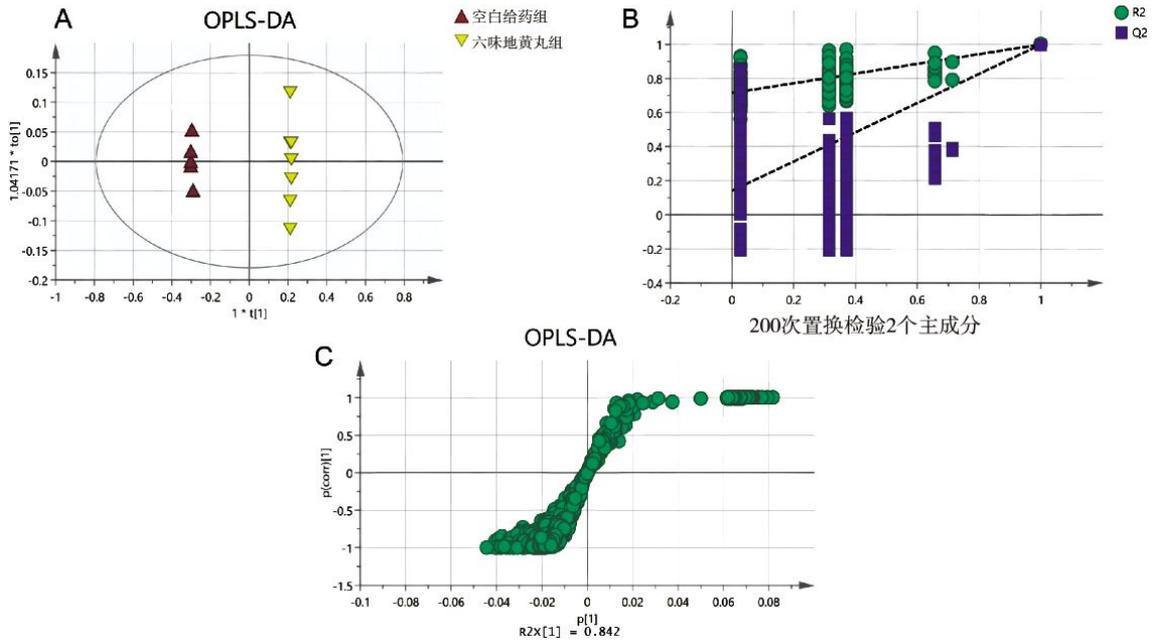


图5 两组仔鼠血清 OPLS-DA 得分图及置换检验

Fig.5 OPLS-DA score diagram and permutation test of serum of offspring rats in two groups

注: A.OPLS-DA 得分图; B.置换检验; C.S-plot 图。

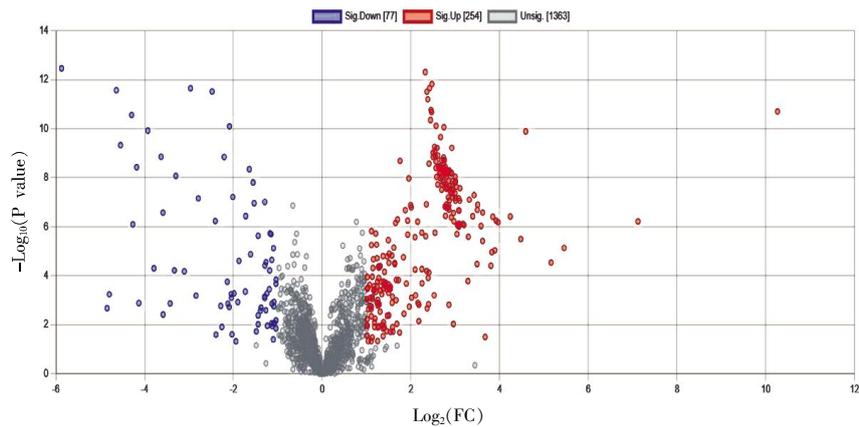


图6 两组仔鼠血清差异代谢物火山图

Fig.6 Volcano diagram of serum differential metabolites of offspring rats in two groups

注: 上调, $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1, P < 0.05$; 下调, $\text{Log}_2(\text{FC}) < -1, P < 0.05$ 。

差异代谢物。通过分析其在相关代谢通路中的生物学功能,确定了嘌呤、2-(2-氨基乙基)吡啶、四癸胺、丁烯酰肉碱、鞘氨醇、吡哆醇(维生素 B₆)及 α-亚麻

酸等作为六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的关键差异代谢物。详见表 2。

为探究差异代谢物的整体生物学意义,将筛选

表 2 两组仔鼠血清关键差异代谢物分析

Table 2 Analysis of key serum differential metabolites of offspring rats in two groups

序号	保留时间	质荷比	相对分子量	分子式	误差	差异代谢物	HMDB 编号	代谢通路	$\text{log}_2(\text{FC})$	P 值	VIP 值
1	17.214	121.051	120.044	C ₅ H ₄ N ₄	0.01	嘌呤	HMDB0001366	上调	3.615 6	0.000 003 82	1.545
2	13.338	123.091	122.084	C ₇ H ₁₀ N ₂	4.97	2-(2-氨基乙基)吡啶	HMDB0244915	上调	3.090 3	0.000 000 87	1.571
3	16.855	170.082	169.074	C ₈ H ₁₁ NO ₃	-2.65	吡哆醇(维生素 B ₆)	HMDB0000239	下调	-1.138 4	0.008 886 30	1.206
4	30.997	214.253	213.246	C ₁₄ H ₃₁ N	0.06	四癸胺	HMDB0258887	上调	1.952 7	0.000 000 01	1.615
5	5.536	230.138	229.131	C ₁₁ H ₁₉ NO ₄	4.60	丁烯酰肉碱	HMDB0249460	上调	3.197 4	0.000 000 85	1.572
6	35.774	279.231	278.225	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-0.28	α-亚麻酸	HMDB0001388	上调	1.963 3	0.001 826 90	1.332
7	40.919	300.290	299.282	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	-2.20	鞘氨醇	HMDB0000252	上调	1.111 2	0.000 005 58	1.563

得到的 42 个差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 平台进行代谢通路富集分析。结果显示,两组差异代谢物主要富集的代谢通路为鞘脂代谢、维生素 B₆ 代谢、亚麻酸代谢、卟啉代谢。详见图 7。

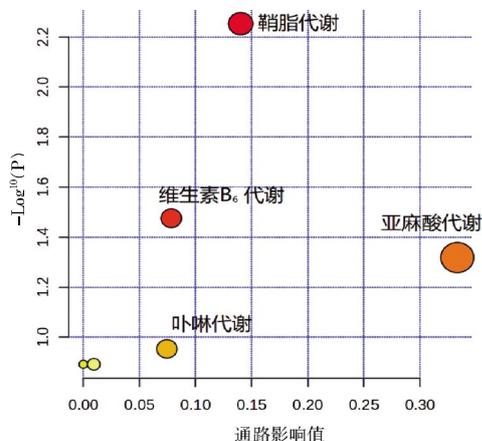


图 7 两组仔鼠血清代谢通路分析图

Fig.7 Analysis diagram of serum metabolic pathways of offspring rats in two groups

3.5 显效状态下六味地黄丸入脑成分分析

经与对照品比较及文献数据验证,最终从六味地黄丸组大鼠脑组织中鉴定出甜菜碱、2-呋喃甲酸、腺苷、丹皮酚、萆薢宁、薯蓣皂苷、齐墩果酸、亚油酸及棕榈酸共 9 种入脑成分。详见表 3。

3.6 六味地黄丸入脑成分与差异代谢物关键酶的分子对接

利用分子对接计算六味地黄丸 9 种入脑成分与其差异代谢物关键酶[包括腺苷酸琥珀酸裂解酶(adenylosuccinate lyase, ADSL)、5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成酶(phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, PRPS)、脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)、酰胺酶(acyl-amide hydrolase, Acy)、肉碱棕

榈酰转移酶 1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)、鞘氨醇激酶 2(sphingosine kinase 2, SphK2)、吡哆醇激酶(pyridoxine kinase, PDXK)、脂肪酸去饱和酶 2(fatty acid desaturase 2, FADS2)]的结合能。结果显示,各差异代谢物关键酶与薯蓣皂苷、齐墩果酸结合能力最强,其中 ADSL、Acy、CPT1、PDXK、FADS2 与薯蓣皂苷,CPT1、PDXK 与齐墩果酸结合能均小于 $-10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。具体结合能数值详见图 8。选择三对结合能力最强的入脑成分与差异代谢物关键酶进行可视化展示,其中 PDXK 与齐墩果酸、薯蓣皂苷之间通过氢键和疏水作用协同,均形成稳定的复合物;CPT1 与薯蓣皂苷形成稳定的复合物,结合位点位于蛋白表面由疏水口袋+芳香环凹槽构成的活性腔中,未发现传统意义上的经典氢键,主要依靠疏水作用稳定配体构象。详见图 9。

4 讨论

六味地黄丸为钱乙所创,方中重用熟地黄补肾填精,山茱萸、山药滋补肝脾肾三阴,配伍茯苓、牡丹皮、泽泻利水渗湿、清泄相火,共奏滋补肝肾之功^[9]。目前研究多集中于六味地黄丸化学成分分析及其在防治神经退行性疾病的潜在作用^[20-21],但其治疗 ASD 肝肾不足证的药效物质基础尚未阐明。

本研究采用孕期腹腔注射 VPA 构建 ASD 模型,该造模方式影响胚胎神经发育并易导致发育迟缓和畸形^[22],符合中医先天不足、禀赋异常的病因病机。同时,后期通过左甲状腺素钠灌胃结合夹尾情志刺激模拟拟肝肾阴虚不足的证候,最终建立 ASD 肝肾不足证模型。行为学与病理学结果显示,该模型仔鼠表现出典型的社交障碍及前额叶皮质组织损伤,而六味地黄丸干预能显著改善其社交行为并缓解前额叶皮质组织损伤。在此基础上,为深入探究其药效

表 3 六味地黄丸入脑成分分析

Table 3 Analysis of brain-penetrating components of LWDHP

序号	Rt/min	离子模式	分子量	分子式	入脑成分	归属
1*	1.375	[M+H] ⁺ 118.085 8	117.078 8	C ₅ H ₁₁ NO ₂	甜菜碱	山药
2	1.892	[M+H] ⁺ 113.034 0	112.015 9	C ₅ H ₄ O ₃	2-呋喃甲酸	熟地黄
3	2.602	[M+H] ⁺ 268.103 9	267.096 5	C ₉ H ₁₇ NO ₈	腺苷	茯苓、泽泻
4*	24.690	[M+H] ⁺ 167.071 1	166.063 5	C ₉ H ₁₀ O ₃	丹皮酚	牡丹皮
5	28.415	[M+H] ⁺ 274.274 5	273.267 3	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	萆薢宁	山药
6	36.348	[M+H] ⁺ 991.674 1	990.664 3	C ₃₆ H ₉₄ O ₁₄	薯蓣皂苷	山药
7	43.123	[M-H] ⁻ 455.343 5	456.711 0	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	齐墩果酸	牡丹皮
8	44.119	[M-H] ⁻ 279.235 8	280.243 0	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸	牡丹皮
9*	46.485	[M-H] ⁻ 255.233 6	256.241 3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	牡丹皮/茯苓

注:* 为对照品比对。



图8 六味地黄丸入脑成分与其差异代谢物关键酶结合能热图

Fig.8 Heatmap of binding energy between brain-penetrating components of LWDHP and its key enzymes of differential metabolites

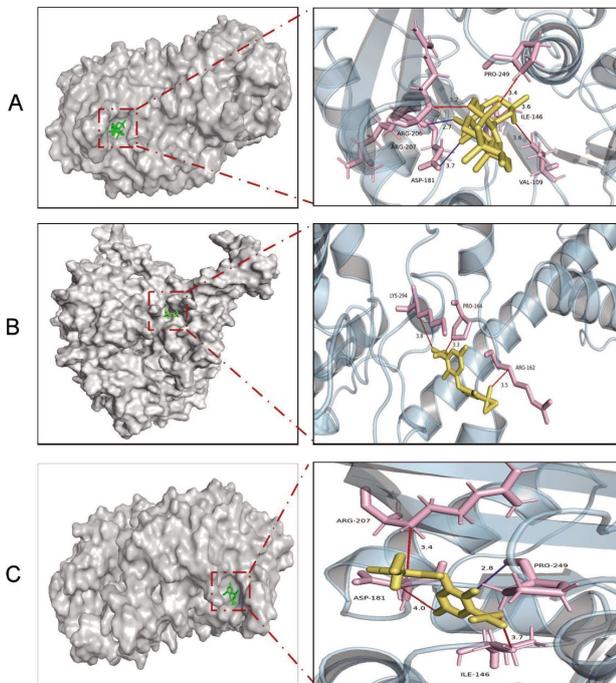


图9 六味地黄丸入脑成分与其差异代谢物关键酶分子对接可视化代表图

Fig.9 Representative visualization diagram of molecular docking between brain-penetrating components of LWDHP and its key enzymes of differential metabolites

注:A.PDXK与齐墩果酸分子对接图;B.CPT1与薯蓣皂苷分子对接图;C.PDXK与薯蓣皂苷分子对接图。红色连接线为疏水相互作用;蓝色连接线为氢键。

物质基础,本研究进一步利用代谢组学研究六味地黄丸对ASD肝肾不足证大鼠血液代谢的影响,共筛选鉴定出与之相关的42个差异代谢物,进一步通路分析显示,上述差异代谢物主要富集于鞘脂代谢、维生素B₆代谢、亚麻酸代谢及卟啉代谢4条关

键通路,这些通路在维持神经系统功能中具有重要作用。

鞘脂代谢的关键酶包括SphK2、CPT1、FAAH及Acy。SphK2催化鞘氨醇磷酸化生成1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P);S1P信号通路失衡与ASD中小胶质细胞的异常激活密切相关^[23]。CPT1是线粒体外膜的关键限速酶,是脂肪酸 β -氧化的主要调控点;其活性下降可导致神经组织中脂质沉积与能量代谢危机,这与ASD线粒体功能障碍表型一致^[24]。FAAH负责水解内源性大麻素花生四烯乙醇胺(anandamide, AEA),其活性降低导致AEA水平升高,进而使参与情绪和认知调节的大麻素I型受体(cannabinoid receptor 1, CB1R)表达异常,最终诱发社交缺陷与刻板行为;因此,FAAH被视为ASD的潜在干预靶点^[25]。此外,研究证实,靶向抑制FAAH可改善VPA诱导的ASD模型突触功能障碍^[26]。Acy则广泛参与水解N-酰基酰胺类信号分子,与FAAH协同调控脂质-神经递质交叉对话,其功能失衡影响突触可塑性^[27]。本研究结果显示,六味地黄丸可回调异常的鞘氨醇水平。鞘氨醇作为鞘脂代谢的重要前体^[28],其水平变化可影响上述多条ASD相关病理轴。因此,六味地黄丸可能通过调节鞘脂代谢发挥对ASD的改善作用。

PDXK是维生素B₆代谢中的关键激酶,负责将吡哆醇/吡哆醛转化为活性形式磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)^[29]。PLP作为谷氨酸、5-羟色胺及多巴胺等关键神经递质合成的必需辅酶,其稳态对维持神经兴奋-抑制平衡至关重要^[30]。PDXK功能紊乱导致PLP活化异常,可引起中枢神经递质失

衡,这与 ASD 的病理机制紧密关联^[31-32]。本研究结果显示,六味地黄丸能纠正维生素 B₆ 代谢紊乱,表明其可能通过恢复神经递质稳态发挥疗效。

FADS2 是亚麻酸代谢途径中的限速酶,催化亚麻酸向 γ -亚麻酸及二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)的去饱和反应^[33]。FADS2 活性降低导致 DHA 合成不足,进而影响突触膜的流动性并阻碍神经炎症的消退^[34]。该酶的异常在 ASD 患者外周血及大脑皮质组织中均得到证实^[35]。本研究观察到六味地黄丸对模型组仔鼠血液中异常 α -亚麻酸水平的调节作用,提示其可能通过维持神经膜结构稳态参与神经保护。

ADSL 与 PRPS 是连接嘌呤合成与卟啉代谢的关键酶^[36-37]。ADSL 功能异常导致富马酸累积,后者一方面抑制干扰素基因刺激因子信号通路,另一方面干扰血红素合成过程;临床表现为语言发育迟滞与社交障碍,即 ADSL 缺乏症^[38]。PRPS1 基因突变则引起嘌呤合成障碍,导致智力障碍与肌张力低下,部分患者呈现出 ASD 表型^[39]。本研究中,六味地黄丸对模型组仔鼠血液中异常嘌呤水平的调节作用,提示其药效机制可能涉及对卟啉代谢通路及相关能量代谢异常的纠正。

为进一步阐明药效物质基础,本研究基于显效状态分析六味地黄丸入脑成分,鉴定出甜菜碱、萜萜宁、薯蓣皂苷、2-咪喃甲酸、腺苷、齐墩果酸、丹皮酚、亚油酸及棕榈酸共 9 种成分。利用分子对接计算上述 9 种入脑成分与其差异代谢物关键酶(包括 ADSL、PRPS、FAAH、Acy、CPT1、SphK2、PDXK、FADS2)的结合能,发现薯蓣皂苷与齐墩果酸对上述关键酶均表现出较高亲和力。药理研究证实,六味地黄丸中的有机酸类、苷类等成分具有调节糖脂代谢、免疫及神经保护等多重药理活性^[40]。其中,甜菜碱与丹皮酚具有抗炎与神经保护活性^[41-42];腺苷可调节炎症反应^[43];亚油酸与棕榈酸参与维持神经元膜结构^[44];薯蓣皂苷能抑制神经元凋亡^[45];齐墩果酸具有广泛的神经保护作用^[46],最新研究发现,其通过促进神经元分化与突触发育改善 ASD 大鼠社交行为^[47]。

综上所述,本研究首次运用中医方证代谢组学研究策略,从内源性小分子代谢物层面系统阐释六味地黄丸治疗 ASD 肝肾不足证的物质基础。后续研究将聚焦于对这些候选药效成分及其作用机制进行实验验证。

参考文献

- [1] WANG M, ZHANG X Z, ZHONG L Y, et al. Understanding autism: Causes, diagnosis, and advancing therapies[J]. *Brain Research Bulletin*, 2025, 227: 111411.
- [2] AYOUB G. Autism spectrum disorder as a multifactorial disorder: The interplay of genetic factors and inflammation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(13): 6483-6502.
- [3] 王小贝, 张丽. 靳三针联合益智填髓推拿法治疗儿童智力障碍肝肾不足证 32 例临床观察[J]. *中医儿科杂志*, 2024, 20(3): 77-82.
- [4] 陈自佳, 韩枝彤, 王素梅. 王素梅从肾脑论治孤独症谱系障碍临床经验[J]. *北京中医药*, 2023, 42(6): 648-650.
- [5] 湖南省中医药和中西医结合学会儿科专业委员会. 儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 169-175.
- [6] 荣红国, 巩舒扬, 张馨月, 等. 六味地黄丸在儿科中的历史沿革与现代临床应用分析[J]. *中医药学报*, 2025, 53(1): 57-61.
- [7] 侯文晓, 司蕊豪, 刘羽茜, 等. 六味地黄丸通过 Fc γ R II B/c- α 通路干预自噬防治阿尔茨海默病的分子机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2025, 27(3): 724-738.
- [8] 吴志伟, 彭永, 杨珊珊, 等. 六味地黄丸治疗肝肾阴虚型帕金森病相关辨证论治的研究进展[J]. *世界中医药*, 2023, 18(7): 1052-1056.
- [9] 童黄锦, 杨月东, 邓良英, 等. 六味地黄丸对肾虚型绝经后女性冠心病经皮冠状动脉介入治疗术后的临床研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(14): 1469-1473.
- [10] 韩红波, 刘春姿, 汤锦菲, 等. 六味地黄丸联合综合训练治疗大龄儿童弱视的临床研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(6): 527-532.
- [11] 刘鸿达, 孔玲, 孙晖, 等. 方证代谢组学理论及方法的形成和发展[J]. *中草药*, 2025, 56(8): 2629-2637.
- [12] 朱琳, 侯丽华, 孙红, 等. 中医方证代谢组学在中医药领域的应用[J]. *中国药物与临床*, 2025, 25(12): 783-790.
- [13] 吴吉, 郝兴宇, 叶勇, 等. 基于 BDNF/TrkB/CREB 通路研究六味地黄丸对丙戊酸钠诱导的孤独症谱系障碍模型仔鼠的作用机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 176-184.
- [14] 叶勇, 吴吉, 赵凡, 等. 基于网络药理学结合动物实验探究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍的作用机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 185-196.
- [15] SCHNEIDER T, TURCZAK J, PRZEWŁOCKI R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(1): 36-46.
- [16] 张雪, 佟玉良, 夏天利, 等. 六味地黄丸入血、入脑成分分析[J]. *中成药*, 2023, 45(11): 3534-3539.
- [17] 李瑞暖, 刁丽梅. 探索急性癫痫肝肾阴虚证病证结合动物模型构建思路[J]. *中医药学报*, 2023, 51(2): 88-92.
- [18] 王剑飞, 韩俊海, 张子超, 等. 孤独症谱系障碍小鼠模型行为学检测方法[J]. *遗传*, 2021, 43(5): 501-519.
- [19] 戚瑜清, 于彦威, 郭智超, 等. 补阴方六味地黄丸的源流考察[J]. *浙江中医药大学学报*, 2025, 49(3): 345-350.

- [20] 陈 荣, 钟水生, 王亚琼, 等. 六味地黄丸定量分析方法和评价体系的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(16): 177-184.
- [21] 雷 霞, 王加朋, 佟玉良, 等. 六味地黄丸对阿尔茨海默病秀丽隐杆线虫模型的神经保护作用[J]. 中成药, 2024, 46(2): 615-619.
- [22] ZARATE-LOPEZ D, TORRES-CHÁVEZ A L, GÁLVEZ-CONTRERAS A Y, et al. Three decades of valproate: A current model for studying autism spectrum disorder[J]. *Current Neuropharmacology*, 2024, 22(2): 260-289.
- [23] WU H M, ZHANG Q Z, GAO J Q, et al. Modulation of sphingosine 1-phosphate (S1P) attenuates spatial learning and memory impairments in the valproic acid rat model of autism[J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235(3): 873-886.
- [24] NGO J, CHOI D W, STANLEY I A, et al. Mitochondrial morphology controls fatty acid utilization by changing CPT1 sensitivity to malonyl-CoA[J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(11): EMBJ2022111901.
- [25] WANG F, LIU Z H, HU J Y, et al. Activation of CB1R alleviates autism spectrum disorder-like behavior and synaptic impairments[J]. *Life Sciences*, 2025, 377: 123797.
- [26] WU H F, LU T Y, CHU M C, et al. Targeting the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorate the endocannabinoid-mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism[J]. *Neuropharmacology*, 2020, 162: 107736.
- [27] 张晓侠, 刘时璋, 刘晓梅, 等. 抑制杏仁核沉默信息调节因子2和谷氨酰胺酶表达可改善自闭症大鼠社交行为[J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(6): 707-715.
- [28] FAROOQUI A A, FAROOQUI T. Phospholipids, sphingolipids, and cholesterol-derived lipid mediators and their role in neurological disorders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(19): 10672.
- [29] GRAZIANI C, BARILE A, ANTONELLI L, et al. The Z isomer of pyridoxilidenerhodanine 5'-phosphate is an efficient inhibitor of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase, a crucial enzyme in vitamin B₆ salvage pathway and a potential chemotherapeutic target[J]. *The FEBS Journal*, 2024, 291(22): 4984-5001.
- [30] GIRGIS V, THARINGTON A, TRIVETT J, et al. Moderate pyridoxal phosphate deficiency enhances neuronal excitability and promotes calcium dysregulation[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2025, 19: 1621349.
- [31] ZHENG L F, JIAO Y M, ZHONG H L, et al. Human-derived fecal microbiota transplantation alleviates social deficits of the BTBR mouse model of autism through a potential mechanism involving vitamin B(6) metabolism[J]. *mSystems*, 2024, 9(6): e00257-24.
- [32] DI SALVO M L, SAFO M K, CONTESTABILE R. Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 4(3): 897-913.
- [33] MACLEOD B, WANG C X, BROWN L H, et al. Fads2 knock-out mice reveal that ALA prevention of hepatic steatosis is dependent on delta-6 desaturase activity[J]. *Journal of Lipid Research*, 2024, 65(10): 100642.
- [34] WANG C X, HUCIK B, SARR O, et al. Delta-6 desaturase (Fads2) deficiency alters triacylglycerol/fatty acid cycling in murine white adipose tissue[J]. *Journal of Lipid Research*, 2023, 64(6): 100376.
- [35] SUN C H, ZOU M Y, WANG X L, et al. FADS1-FADS2 and ELOVL2 gene polymorphisms in susceptibility to autism spectrum disorders in Chinese children[J]. *BMC Psychiatry*, 2018, 18(1): 283.
- [36] FENTON A R, JANOWITZ H N, FRANKLIN L P, et al. A caenorhabditis elegans model of adenylsuccinate lyase deficiency reveals neuromuscular and reproductive phenotypes of distinct etiology[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2023, 140(3): 107686.
- [37] JUNG S, KOO K M, RYU J, et al. Overexpression of phosphoribosyl pyrophosphate synthase enhances resistance of Chlamydomonas to ionizing radiation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 719846.
- [38] DUAN Y R, HU Z Q, HAN P, et al. ADSL-generated fumarate binds and inhibits STING to promote tumour immune evasion[J]. *Nature Cell Biology*, 2025, 27(4): 668-682.
- [39] DEWULF J P, MARIE S, NASSOGNE M C. Disorders of purine biosynthesis metabolism[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2022, 136(3): 190-198.
- [40] 马萌萌, 关徐涛, 孙士玲. 经典名方六味地黄丸的研究进展及质量标志物预测[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-19[2025-11-05]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252195>.
- [41] 赵天源, 王 菁, 王雨露, 等. 甜菜碱神经保护作用的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2025, 15(2): 220-225.
- [42] 杜 松, 范佩娟, 王 夏, 等. 丹皮酚治疗帕金森病病理作用机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(4): 109-113.
- [43] 王 洁, 谭小红, 张正艳, 等. 腺苷对大鼠缺氧/复氧星形胶质细胞的保护作用[J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(5): 539-541, 545.
- [44] GHAREGHANI M, ZIBARA K, AZARI H, et al. Safflower seed oil, containing oleic acid and palmitic acid, enhances the stemness of cultured embryonic neural stem cells through Notch1 and induces neuronal differentiation[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11: 446.
- [45] 陈子馨, 陈志惠, 罗文川, 等. 薯蓣皂苷抑制氧糖剥夺/复氧 HT22 细胞凋亡的机制[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(2): 277-283.
- [46] CHEN C, AI Q D, SHI A X, et al. Oleanolic acid and ursolic acid: Therapeutic potential in neurodegenerative diseases, neuropsychiatric diseases and other brain disorders[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2023, 26(5): 414-428.
- [47] 任怡兵, 周 波, 汤 磊. 齐墩果酸在孤独症谱系障碍大鼠模型中的治疗作用机制[J]. *贵州医科大学学报*, 2025, 50(11): 1602-1610.