

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.009

荷瘤抑郁样模型小鼠的血清代谢组学研究*

康 雷^{1,2} 江 涛¹ 葛新星¹ 彭 良¹ 谢 瑛¹ 李华芳³ 荣征星¹ 祁 红^{1,△}

(1 上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200080; 2 上海交通大学附属第一人民医院药剂科 上海 200080;

3 上海交通大学医学院附属精神卫生中心 上海 200030)

摘要 目的:从代谢组学角度开展肿瘤共病抑郁的研究,将在复杂疾病发生发展机制以及药物治疗新靶点方面做出有益探索。本实验采用代谢组学方法检测荷瘤抑郁样模型小鼠血清小分子代谢物的变化及抗抑郁药氟西汀的影响,探讨代谢组学在肿瘤共病抑郁研究中的应用。**方法:**制备移植性荷瘤小鼠模型,氟西汀处理组对荷瘤小鼠连续 28 d 灌胃给药,观察各组行为学反应。采用液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(LC-QToF/MS)获取荷瘤小鼠与正常小鼠的血清代谢轮廓,并用正交信号校正的偏最小二乘法(OPLS)进行多元统计分析,结合单维水平筛选结果,得到荷瘤小鼠区别于正常对照小鼠的特征性差异代谢物,并观察氟西汀对上述代谢物的影响。**结果:**行为学反应结果显示,与正常小鼠相比,荷瘤小鼠表现抑郁相关性行为改变,氟西汀对荷瘤引起的行为学变化有显著改善作用。代谢组学分析结果显示,荷瘤小鼠血清中乙酰肉碱和油酰胺的含量较正常小鼠显著降低,氟西汀处理后可增加荷瘤小鼠血清中的乙酰肉碱和油酰胺的含量。**结论:**基于代谢组学分析得到的特征性代谢产物的下调可能与荷瘤小鼠的抑郁样状态有关,氟西汀对这两种潜在生物标志物有明显的调节作用。代谢组学研究为疾病特异性生物标志物的筛选及药物药效的评价提供了新的思路与方法。

关键词:代谢组学;LC-QToF/MS;荷瘤;抑郁症;氟西汀

中图分类号:Q95-3, R730.231, R964 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-42-05

Serum Metabolomics Study in Depressive-Like Mice Model Induced by Tumor-Bearing State*

KANG Lei^{1,2}, JIANG Tao¹, GE Xin-xing¹, PENG Liang¹, XIE Ying¹, LI Hua-fang³, RONG Zheng-xing¹, QI Hong^{1,△}

(1 Dept. of Pharmacology, Institute of Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Dept. of Pharmacy, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China;

3 Shanghai Institute of Mental Health, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: To carry out a tumor comorbid depression research from the perspective of metabolomics will make a useful exploration for the mechanism of the occurrence and development of complex diseases and the new target of drug treatment. The purpose of this study was to investigate low-molecular metabolites in serums of tumor-bearing mice with depressive-like behaviors by metabolomics method, and evaluate the effect of antidepressant agent fluoxetine. **Methods:** The tumor-bearing mice model was established by tumor inoculation. Fluoxetine was orally administrated for a consecutive 28-day period after the inoculation. The depressive state of tumor-bearing mice was evaluated by behavioral responses. The metabolomic profiles were acquired based on liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometer (LC-QToF/MS). The metabolites in serum of tumor-bearing mice characteristically different from control mice were obtained by orthogonal signal correction-partial least squares (OPLS) as multivariate statistical analysis followed by one-dimensional screening analysis. The effect of fluoxetine on the level of these characteristic metabolites was also observed. **Results:** The tumor-bearing mice exhibited depression-like behavior changes compared with that in the control group. The treatment of fluoxetine significantly improved behavioral responses caused by tumor burden. Compared with that in the controls, the serum concentrations of acetyl-L-carnitine and oleamide decreased significantly in the tumor-bearing group. While in the fluoxetine-treated group, the concentrations of these endogenous compounds increased. **Conclusion:** The down-regulation of characteristic metabolites derived from metabolomics analysis was associated with the depression-like state of the tumor-bearing mice. The abnormal changes of serum metabolites could be alleviated by the treatment of antidepressant agent fluoxetine. The metabolomics provides new insight and strategy for disease-specific biomarkers screening and drug efficacy evaluation.

Key words: Metabolomics; LC-QToF/MS; Tumor; Depression; Fluoxetine

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R730.231, R964 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-42-05

* 基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2012ZX09303-003); 国家自然科学基金项目(81071887, 81101027); 上海市博士后科研基金项目(11R21415100)

△ 通讯作者: 祁红, E-mail: qihong@shsmu.edu.cn

(收稿日期: 2013-06-17 接受日期: 2013-07-27)

前言

抑郁症是肿瘤患者最常见的并发症之一,肿瘤患者抑郁症的发病率远高于一般正常人群^[1]。抑郁症不仅增加肿瘤患者对疼痛的敏感性,还可抑制免疫功能,从而严重影响肿瘤患者的生存质量及预后^[2]。因此,开展肿瘤共病抑郁的生物学发病机制的研究对于抗抑郁药辅助的肿瘤治疗具有重要临床意义。肿瘤共病抑郁的病因机制非常复杂,与其关联的神经、内分泌、免疫三大系统不仅各自具有复杂的生物分子网络、自身调节和自我反馈功能,而且彼此之间借助于神经递质、细胞因子和内分泌激素而联结成复杂庞大的网络,在更高层次上相互作用、相互制约。这三个系统之间平衡的破坏或任何一个系统内部环节的异常都可能导致疾病的发生,因此,相对孤立的研究方法难以掌握机体全面动态的变化。基于系统和整体水平的代谢组学研究^[3],是对生命体因病理生理刺激、药物干预、遗传变异或环境等因素引起的内源性物质代谢应答改变及其随时间、空间变化所致的动态多参数分析。相对于受体和信号通路而言,代谢物通路是各种反应的最终共同通路,不受中间环节的影响,是对基因组学和蛋白质组学研究的完善和补充^[4]。代谢组学借助高通量、高灵敏度与高精度的分析技术,对小分子代谢物进行代谢轮廓分析和代谢指纹图谱分析,通过研究疾病相关的生物标志物(群)^[5],从系统水平揭示肿瘤共病抑郁的生物学机制。

本研究利用基于液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(LC-QToF/MS)的血清代谢组学分析方法,从分子量 50-750 Da 的小分子入手,全面考察荷瘤抑郁样小鼠血清内源性小分子代谢物的改变,推断可能改变的代谢途径,寻找与疾病相关的特异性生物标志物。研究结果将有助于阐明肿瘤相关性抑郁症可能的病理机制,为抗抑郁药物的肿瘤辅助治疗提供新的作用位点。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 双三元泵高效液相色谱仪(Dionex 公司,美国);MicroTOF-QII 四级杆飞行时间质谱仪(Bruker Daltonics 公司,德国);BT 224S 电子天平(Sartorius 公司,德国);G-560E 型涡旋震荡器(Scientific Industries 公司,德国);Sigma 3K18 高速冷冻离心机(Sigma 公司,德国);OA-SYS 型干浴氮气吹干仪(Organomation 公司,美国);BCD-254 型冰箱(Siemens 公司,德国);Forma -80℃ 超低温冰箱(Thermo Scientific 公司,美国)。盐酸氟西汀购自美国 sigma-aldrich 公司;乙腈、甲酸、水均为色谱纯试剂,购自美国 Tedia 公司;替米沙坦(Telmisartan, Tel)由德国 Boehringer Ingelheim 公司提供。

1.2 荷瘤抑郁样小鼠模型的建立

1.2.1 动物分组及处理 清洁级 C57B/L 雄性小鼠 36 只,5 周龄,体重 15.2-18.0 g,购自上海西普尔-必凯实验动物资源中心,合格证号:SCXK(沪)2007-0003。动物房内温度保持在 20-25℃,湿度为 50-60%,昼夜节律光照。动物饲养三天以适应新环境,称重并按完全随机数字法进行分组:正常组(control, Ctrl),荷瘤组(tumor-bearing mice, DIS),氟西汀(flouxetine, FLU)给药组,每组 12 只。

采用已报道的方法建立荷瘤模型^[6]。荷瘤组、氟西汀组小鼠于右前肢腋窝部位皮下接种 Hepa1-6 瘤细胞悬液 0.2 mL,细胞浓度为 5×10^7 个/mL。氟西汀组(20 mg/kg)于接种后第 2 天灌胃给药,每天 1 次,持续 28 天,其余组用生理盐水平行处理。

1.2.2 开场实验 实验装置为一只不透明敞箱,高 31 cm 的周壁为黑色,底为 25×25 cm 的正方形,等分为 25 个等边方格。试验在弱光照明、安静环境内进行。将小鼠置于中央区,通过摄像系统和视频合成器记录小鼠的活动情况,采用 DigBehv 动物自发活动视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司,中国)测定小鼠 4 min 内在中央区的停留时间,彻底清洁敞箱后,进行下一只小鼠的行为学测试。每周进行一次行为学评分。

1.2.3 尾悬挂实验^[7] 小鼠末次灌胃给药 1 h 后,用胶布将鼠尾距其尖部 2 cm 处贴在一水平木棍上,使动物成倒挂状态,头离台面 15 cm 以上,两侧用板隔开相邻动物的视线,避免干扰。记录小鼠在 6 min 内累计静止的时间。

1.3 血清样品的采集及预处理

末次给药 12 h 后,采集小鼠全血,4℃ 静置 12 h,4500 rpm 离心 10 min,取上层血清于 -80℃ 保存备用。取 40 μL 空白血清,加入 10 μL 内标 Tel(5 ng/mL)和 160 μL 沉淀剂(甲醇:乙醇:丙酮,1:1:1, v/v/v),涡旋振荡 1 min 后,4℃ 18000×g 离心 5 min,取上清 170 μL,用氮气挥干后,以 80 μL 复溶溶剂(70%甲醇水溶液)复溶,涡旋振荡 1 min 后 4℃ 18000×g 离心 5 min,取上清 10 μL 进样。

1.4 色谱质谱条件

色谱条件:色谱柱为 Merck ZIC-HILIC Column(2.1×100 mm, 3.5 μm);流动相 A:0.1%甲酸-水,流动相 B:0.1%甲酸-乙腈,梯度洗脱:0-5 min 90-65%B, 5-10 min 65%B, 10-20 min 90%B;流速:0.3 mL/min;柱温:30℃;自动进样器温度:4℃;进样量:10 μL。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI),采集模式:正离子模式,干燥气流速:8 L/min,喷雾气压力:0.8 Bar,干燥气温度:180℃,Endplate offset=-500 V,毛细管电压=4500 V,质量采集范围=50-750 Da。

1.5 数据处理

LC-QToF/MS 采集的原始数据以 ProfileAnalysis 2.0 软件(Bruker Daltonics 公司,德国)预处理。首先对总离子流色谱图进行滤噪、基线矫正、色谱峰判别及匹配,然后通过内标归一化、pareto 数据缩放及 80%规则处理^[8],得到三维矩阵数据集,坐标为:化合物的特征性指标质荷比(m/z),样品名及归一化后的峰面积。将矩阵导入 SIMCA-P 12.0(Umetrics AB 公司,瑞典)进行多元统计分析,多标准综合评价法筛选潜在生物标志物,并依据所获取的精确质量数、多级质谱(MSn)信息及 METLIN、MassBank、HMDB 等数据库信息进行鉴定。

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据分析,组间比较采用 ANOVA,组间两两比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 时为差别具显著性。

2 结果

2.1 行为学分析

在开场实验中,各组小鼠在中央区的停留时间随实验次数

增加而缩短(图 1A)。建模后两周,各组在中央区的停留时间无显著差异($P>0.05$)。建模后第 3 周,荷瘤组较正常组在中央区的停留时间明显延长($P<0.01$),氟西汀处理后可明显降低荷瘤

组在中央区的停留时间($P<0.05$)。在尾悬挂实验中(图 1B),荷瘤组小鼠尾悬挂累计静止时间较正常组明显延长($P<0.05$),氟西汀可明显缩短荷瘤小鼠累计静止时间($P<0.05$)。

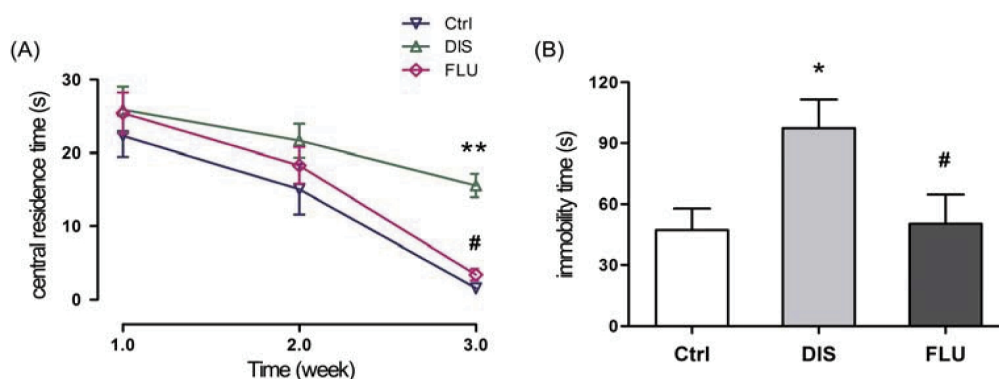


图 1 氟西汀对荷瘤小鼠行为学反应的影响:(A)开场实验中央区停留时间 (** $P<0.01$ 与正常组比较, # $P<0.05$ 与荷瘤组比较);(B)尾悬挂实验累计静止时间 (* $P<0.05$ 与正常组比较, # $P<0.05$ 与荷瘤组比较)

Fig.1 Effects of fluoxetine on behavioral responses in tumor-bearing mice: (A) central residence time of the open field test (** $P<0.01$ vs. Ctrl, # $P<0.05$ vs. DIS); (B) immobility time of the tail suspension test (* $P<0.05$ vs. Ctrl, # $P<0.05$ vs. DIS)

2.2 基于血清样本的代谢组学分析

2.2.1 LC-QToF/MS 分析 从 LC-QToF/MS 分析的典型代谢指纹图谱(图 2)中可明显观察到荷瘤组与正常组血清样品间存在的差别。为避免同组间的个体差异产生的偏倚,需对图谱结果进行统计分析验证,以获取稳定可靠的组间代谢差异。

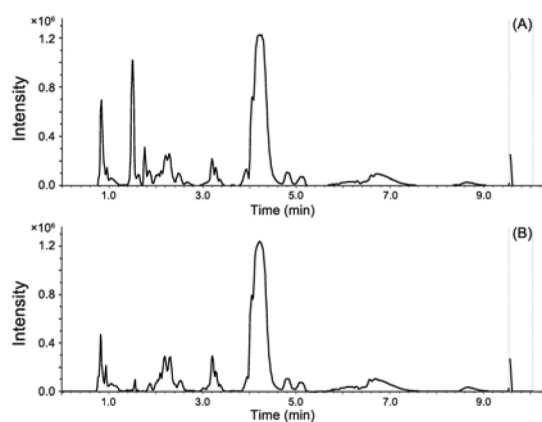


图 2 血清样品 LC-QToF/MS 基峰色谱图:(A):正常组;(B):荷瘤组

Fig. 2 The LC-QToF/MS base peak chromatograms of serums: (A): control mice; (B): tumor-bearing mice

2.2.2 多元统计分析 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 的方法对正常组和荷瘤组小鼠血清代谢谱的数据进行模式识别。PC1/PC2 得分图(图 3A)的散点分布显示两者存在一定的分离趋势,但模型的解释率不够理想(代表解释率的 R^2X 仅为 0.367)。改变建模方式,采用正交信号校正的偏最小二乘法^[9](orthogonal signal correction-partial least squares, OPLS)对模型重新拟合,寻找对两组间代谢轮廓区分贡献较大的差异变量。图 3B 显示,正常组和荷瘤组小鼠分离明显,代表模型累计稳定程度的参数 R^2YCUM 为 0.991,代表模型累计预测能力的参数 Q^2YCUM 为 0.932,说明模型的稳定性和预测率较高,可用于疾病特征性变量的筛选。

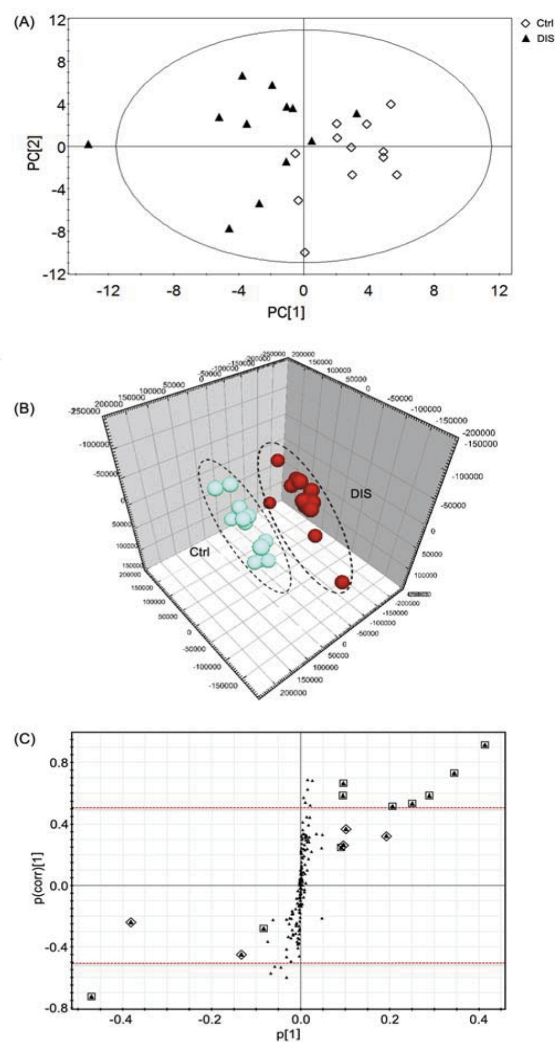


图 3 正常小鼠 (◇) 与荷瘤小鼠 (▲) 血清样品的 PCA 得分图(A), OPLS 三维空间分布图(B)及差异代谢物的 S-plot 图(C)
Fig.3 The PCA score plot (A) of serum in control mice (◇) and tumor-bearing mice (▲), 3D OPLS score plot (B) and S-plot of differential metabolites (C)

建立稳定可靠的数学模型是为了从海量生物学数据中筛选出特征性的变量,挖掘和提取有生物学意义的信息。本实验采用多标准的综合评价方法,筛选变量重要性因子(variable importance in projection,VIP)大于1且满足 Jack-knifed 置信区间(CIJFK)及相关性(correlation coefficients,Pcorr)要求的变量,进一步作为潜在的生物标志物进行定性分析。以VIP值评价变量贡献,VIP>1的变量具统计学意义;以CIJFK置信区间观察变量的贡献及意义,区间值小说明变量越可信,并去除意义不大的跨越0值的CIJFK;以S-plot(图3C)分析相关性及变量的权重系数(协方差)。分布在“S”形两端的变量,相关性 & 权重系数就越大,对模型的贡献也越大。皮尔森相关性检验结果表明|Pcorr|>0.52的变量对模型的贡献较大,去除<0.52的2个变量。S-plot图中的菱形标记为CIJFK跨越0值的变量,说明CIJFK置信区间对变量筛选的有效性。

2.2.3 单维水平差异代谢物的筛选 采用非参数检验(M-W检验)和参数检验(T-检验)的方法对多元统计分析结果进行验证。为克服高维生物统计中假阳性率高的问题,在单维统计的

多重比较中对假发现率^[10](false discovery rate,FDR)进行了考察,排除P值>0.05的3个变量(表1)。

2.2.4 差异代谢物的鉴定 结合荷瘤组和对照组的多元及单维统计分析结果,发现5个差异显著的代谢物。将血清样本重新进行二级质谱扫描,结合网络共享代谢物数据库HMDB和METLIN进行检索,将获得的二级质谱图与标准品比对,成功鉴定了差异代谢物乙酰肉碱(Acetyl-L-carnitine,ALC)及油酰胺。二者在荷瘤组的表达均明显下调,且可被氟西汀逆转(图4)。通过metabolic pathway以及Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)数据库的查询,发现这些物质与脂类代谢及能量代谢变化相关。

3 讨论

已报道多种荷瘤模型动物具抑郁性病态行为^[11]。开场实验结果显示,荷瘤导致小鼠探究活动的减少,反映了其对新异环境好奇程度的降低,即表现出兴趣丧失的抑郁样行为;尾悬挂实验结果显示,呈倒挂状的荷瘤小鼠在一定程度上放弃了为克

表1 血清差异代谢物的统计分析结果

Table 1 A list of differential metabolites in serum derived from OPLS model between control mice and tumor-bearing mice

Var ID (Primary)*	VIP [1]	Pcorr [1]	P (Mann-Whitney Test)	P (T-Test)	P (FDR)	Exact MW*
45.0s : 303.30m/z	1.25174	0.58	0.00182	0.01048	0.00002	303.2313
45.0s : 367.30m/z	1.25584	0.66	0.00389	0.00213	0.01646	367.2233
125.0s : 400.30m/z	4.51593	0.73	0.00066	0.00083	0.00135	400.3413
245.0s : 204.10m/z	3.78473	0.59	0.03266	0.01947	0.04949	204.1223
45.0s : 282.30m/z	5.41815	0.91	0.00003	0.00000	0.00359	282.2784
45.0s : 338.30m/z	6.14113	-0.73	0.00467	0.00373	0.19121	
55.0s : 437.30m/z	3.28027	0.53	0.02824	0.02218	0.82351	
145.0s : 274.30m/z	2.70501	0.52	0.02824	0.05447		
45.0s : 369.30m/z	1.08306	-0.28				
55.0s : 478.30m/z	1.19167	0.25				

Note: * Var ID (Primary): variable identity (Primary); Exact MW, exact molecular weight.

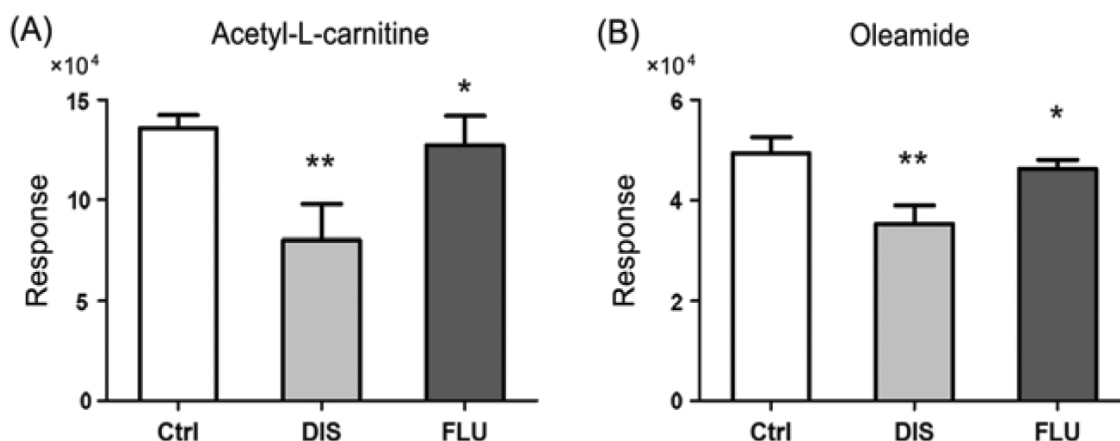


图4 正常组、荷瘤组、氟西汀给药组小鼠血清中乙酰肉碱(A)和油酰胺(B)的半定量分析结果(**P<0.01与正常组比较,*P<0.05与荷瘤组比较)

Fig.4 Semi-quantitation of acetyl-L-carnitine (A) and oleamide (B) in control, tumor-bearing and fluoxetine-administrated mice serum samples

(**P<0.01 vs. Ctrl, *P<0.05 vs. DIS)

服不正常体位而进行的挣扎活动,表现出明显的抑郁样的行为绝望。这些行为学的异常改变与人类抑郁症的临床表现具有一定的相似性,抗抑郁药氟西汀具明显改善作用,提示外周荷瘤可引起继发性的精神行为变化。

ALC 是肉碱(L-Carnitine)酰化的衍生物。在疾病状态下,ALC 的生成明显低于正常。ALC 的代谢变化可影响机体使用脂肪供能的能力。此外,有报道称 ALC 具有神经保护^[12]、神经调节^[13]及神经营养^[14]功能,在对抗中枢神经系统疾病^[15]的过程中发挥重要作用。ALC 能够透过血脑屏障发挥强效的抗氧化作用^[16],阻止脑细胞的坏死;外源性的 ALC 对大鼠脑缺血病理损伤具显著的神经保护作用^[17],并有助于外周神经损伤的治疗^[18]。因此,荷瘤可能导致能量代谢紊乱及 ALC 的异常表达,从而降低其原有的神经活性功能,进而造成海马等脑区神经元损伤和再生障碍,诱发情感障碍性疾病的发生。

油酰胺是天然存在的一种长链脂肪伯胺,属具多种生理活性的新型生物信号分子长链脂肪酰胺家族。研究表明^[19,20],油酰胺可调节 5-羟色胺(5-HT)能神经传导,显著增强 5-HT_{1A}、5-HT_{2A} 及 5-HT_{2C} 受体亚型的活性,其代谢变化与 5-羟色胺的功能密切相关。Fedorova 等报道油酰胺及其类似物有明显的催眠、镇痛、抗焦虑等作用^[21]。荷瘤状态导致油酰胺的异常表达,有可能造成 5-HT 受体亚型传导系统功能损伤,使中枢 5-HT 能神经传导功能低下,从而引起肿瘤相关情感障碍性疾病的发生,具体机制有待进一步研究。

4 结论

本实验采用基于 LC-QToF/MS 技术的代谢组学方法,全景式分析了荷瘤抑郁样模型小鼠和正常对照小鼠的血清代谢谱差异。通过图谱数据预处理、模式识别分析、特征性变量的筛选和鉴定,找到特征性差异代谢物乙酰肉碱和油酰胺,结合氟西汀干预结果发现,荷瘤状态导致 ALC 的异常表达可为选择性 5-HT 再摄取抑制药的典型代表氟西汀所逆转;另外,对内源性油酰胺系统功能的调节也可能是治疗荷瘤共病抑郁的重要靶点。本课题首次从代谢组学角度研究荷瘤共病抑郁代谢标志物的变化,结果将为肿瘤共病抑郁新靶向药物的研发以及抗抑郁药物辅助的肿瘤治疗提供重要实验依据。

参考文献(References)

- [1] Singer S, Das-Munshi J, Brähler E. Prevalence of mental health conditions in cancer patients in acute care-a meta-analysis [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(5): 925-930
- [2] Fisch M. Treatment of Depression in Cancer [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2004, (32): 105-111
- [3] 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(11): 1181-1189
- [4] German JB, Bauman DE, Burrin DG, et al. Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health[J]. *J Nutr*, 2004, 134(10): 2729-2732
- [5] Quinones MP, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 35(2): 165-176
- [6] Qi H, Ma J, Liu YM, et al. Allostatic tumor-burden induces depression-associated changes in hepatoma-bearing mice[J]. *J Neurooncol*, 2009, 94(3): 367-372
- [7] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3): 367-370
- [8] Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, et al. Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation[J]. *Anal Chem*, 2005, 78(2): 567-574
- [9] Şahin S, Işık E, Aybastır , et al. Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms[J]. *J Chemom* 2012, 26(7): 390-399
- [10] Benjamini Y. Discovering the false discovery rate [J]. *J R Stat Soc B (Statistical Methodology)*, 2010, 72(4): 405-416
- [11] Vegas O, Beitia G, Sánchez-Martín JR, et al. Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 155(1): 125-134
- [12] Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Toscano A, et al. The neuropath-protective agent acetyl-L-carnitine activates protein kinase C-gamma and MAPKs in a rat model of neuropathic pain[J]. *Neuroscience*, 2010, 165(4): 1345-1352
- [13] Wu R, Wu Z, Wang X, et al. Metabolomic analysis reveals that carnitines are key regulatory metabolites in phase transition of the locusts [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(9): 3259-3263
- [14] Vivoli E, Di Cesare Mannelli L, Salvicchi A, et al. Acetyl-L-carnitine increases artemin level and prevents neurotrophic factor alterations during neuropathy[J]. *Neuroscience*, 2010, 167(4): 1168-1174
- [15] Soczynska JK, Kennedy SH, Chow CS, et al. Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid: possible neurotherapeutic agents for mood disorders?[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(6): 827-843
- [16] Barhwal K, Hota SK, Jain V, et al. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) prevents hypobaric hypoxia-induced spatial memory impairment through extracellular related kinase-mediated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 phosphorylation[J]. *Neuroscience*, 2009, 161(2): 501-514
- [17] Rump TJ, Muneer PMA, Szlachetka AM, et al. Acetyl-L-carnitine protects neuronal function from alcohol-induced oxidative damage in the brain[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(10): 1494-1504
- [18] Wilson ADH, Hart A, Brännström T, et al. Delayed acetyl-L-carnitine administration and its effect on sensory neuronal rescue after peripheral nerve injury[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2007, 60(2): 114-118
- [19] Thomas EA, Carson MJ, Neal MJ, et al. Unique allosteric regulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signal transduction by oleamide[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(25): 14115-14119
- [20] Boger DL, Patterson JE, Jin Q. Structural requirements for 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(8): 4102-4107
- [21] Fedorova I, Hashimoto A, Fecik RA, et al. Behavioral Evidence for the Interaction of Oleamide with Multiple Neurotransmitter Systems [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(1): 332-342