

短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的初步代谢组学研究

王雪雪¹, 常旭², 欧红利², 江伦², 陶柱萍¹, 厉颖¹, 张成桂^{3,4}, 刘卫红^{3,5}, 高鹏飞^{1,3,4}, 白丽^{2*}

(1.大理大学药学与化学学院, 云南大理 671000; 2.大理大学基础医学院, 云南大理 671000; 3.云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南大理 671000; 4.药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心, 云南大理 671000; 5.大理大学农学与生物科学学院, 云南大理 671000)

摘要 [目的]比较分析短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的肝脏代谢组学机制。[方法]将 12 只 BALB/c 小鼠于接种肿瘤细胞次日(0.2 mL/只), 随机分为模型组与 HFDT1 组, 每组 6 只, 模型组给予生理盐水灌胃, 20 mL/kg, 1 次/d; HFDT1 组给予人工合成短肽 HFDT1(7.8 mg/kg, 10 mL/kg)腹腔注射, 1 次/d, 连续 10 d 给予药物处理, 于末次给药 24 h 后, 收集小鼠肝脏组织。采用¹H NMR 代谢组学技术分析小鼠肝脏代谢谱图差异, 运用 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析方法筛选有显著性差异代谢物, 探索短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的代谢通路。[结果]与模型组相比, 短肽 HFDT1 给药组最终确定了涉及 5 个代谢通路变化的 7 种具有显著性差异的代谢物: 丙酮酸水平显著下调, 磷脂酰胆碱-NCH₂、GPC、肝糖、酪氨酸、烟酰胺及肌昔水平显著上调。[结论]短肽 HFDT1 的抗肿瘤作用机制与抑制糖酵解, 调节酪氨酸代谢、核苷酸代谢、烟酰胺代谢及胆碱磷酸化紊乱密切相关。

关键词 短肽 HFDT1; MFC; ¹H NMR; 代谢组学; 抗肿瘤

中图分类号 R 961.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)04-0088-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.04.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preliminary Metabolomics Research on Anti-tumor Effect of Short Peptide-HFDT1 on MFC Tumor-Bearing MiceWANG Xue-xue¹, CHANG Xu², OU Hong-li² et al (1.School of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000; 2.School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali, Yunnan 671000)

Abstract [Objective] To compare and analyze the liver metabolic mechanism of anti-tumor effect of short peptide HFDT1 on MFC tumor-bearing mice. [Method] Twelve BALB/c mice were randomly divided into model group ($n=6$) and HFDT1 group ($n=6$) after tumor vaccination. The model group was given normal saline perfusion, 20 mL/kg, s.i.d.; HFDT1 group was given intraperitoneum injection of synthetic short peptide-HFDT1, 7.8 mg/kg, 10 mL/kg, s.i.d., ten days after treatment, the liver tissues of mice were collected when 24 hours after the last administration. The differences of liver metabolic spectra in mice were analyzed by ¹H NMR metabolomic. The differential metabolites were screened by PCA, PLS-DA and OPLS-DA, and the metabolic pathway of short peptide-HFDT1 on MFC tumor-bearing mice was explored. [Result] Compared with the model group, seven differential metabolites involving the changes of five metabolic pathways were finally identified in the short peptide-HFDT1 administration group, which showed that pyruvate levels were significantly down-regulated and phosphatidylcholine-NCH₂, GPC, glycogen, tyrosine, nicotinamide and inosine levels were remarkably up-regulated. [Conclusion] The anti-tumor mechanism of short peptide-HFDT1 is closely related to the inhibition of glycolysis and the regulation the disorder of tyrosine metabolism, nucleotide metabolism, niacinamide metabolism, and choline phosphorylation.

Key words Short peptide-HFDT1; MFC; ¹H NMR; Metabolomics; Anti-tumor

胃癌是世界上发病率最高、最致命的恶性肿瘤之一, 其在我国的发病率很高; 据报道, 我国每 10 万人中就有 29.9 例被确诊为胃癌患者, 每年有 22 478 人死于胃癌, 约占世界胃癌死亡人数的 1/2^[1-2]。代谢组学在发现生物标志物、药理药效评价及作用机制研究等方面都发挥着重要作用, 已被广泛应用到癌症研究中^[3-6]。目前常见的代谢组学分析平台有核磁共振波谱(NMR)和质谱。其中, NMR 基于良好的重现性、样品制备简单及无损检测等优点, 成为目前常用而有力的代谢组学分析工具^[7]。

短肽 HFDT1 是从美洲大蠊精制物 CII3 中分离到具有抗肿瘤活性的含 12 个氨基酸残基的短肽, 并根据其序列人工合成。笔者所在课题组在前期研究中已证实, 短肽 HFDT1 能够抑制肿瘤的生长、增强荷瘤小鼠特异性免疫和非特异免

疫的抗肿瘤功效, 且无毒副作用^[8-9], 但它的具体作用机制尚有待深入研究。

有研究报道, 肿瘤的发生发展与体内代谢的变化密切相关^[3]。该研究采用¹H NMR 代谢组学技术, 探索短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用机制, 通过分析模型组与短肽 HFDT1 给药组小鼠肝脏代谢谱的差异, 筛选鉴定与 MFC 荷瘤小鼠抗肿瘤作用相关的有显著性差异代谢物, 以期研究短肽 HFDT1 抗肿瘤作用提供新的思路。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 动物。SPF 级 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体质量 18~20 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号: SYXK(湘)2016-0002。

1.1.2 肿瘤细胞株。小鼠胃癌细胞(MFC), 源于 615 小鼠胃癌组织, 属于上皮肿瘤细胞系, 细胞株保有血道转移的特性, 购自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所(原中国科学院上海细胞生物学研究所)。

1.1.3 主要仪器。Bruker 800 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); 组织破碎仪[迈尔莱客(广州)工业技术有限公司]; 低温高速离心机(西格玛实验室离心机公司); 冷冻干燥

基金项目 国家自然科学基金项目(81260676, 81360319, 81960712, 31760158); 云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项(2018FH001-097); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2013Z154); 云南省 2011 协同创新中心(大理大学)2018 年开放课题(CIC1805); 云南省科技厅重点项目(2014FA007)。

作者简介 王雪雪(1993—), 女, 陕西扶风人, 硕士研究生, 研究方向: 代谢组学。*通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事临床免疫学研究。

收稿日期 2019-10-08

机[金西盟(北京)仪器有限公司];真空离心浓缩仪(北京源生行仪器设备有限公司)。

1.1.4 受试药物。短肽 HFDT1 从美洲大蠊精制物 CII3 中分离到具有抗肿瘤活性的含 12 个氨基酸残基的短肽,并根据其序列人工合成(专利号:2017100567877,专利申请人:大理大学,由大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室提供)^[8-9]。

1.1.5 主要试剂及用品。磷酸二氢钠(NaH_2PO_4 , 国药集团化学试剂有限公司,批号:20150417);磷酸氢二钾(K_2HPO_4 , 国药集团化学试剂有限公司,批号:20150312);FCS(Gibco 公司);RPMI-1640 培养基(Gibco);Cell Strainer(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞体外培养及荷瘤小鼠模型建立。取 MFC 细胞株常规复苏,用 10% FCS-RPMI-1640 完全培养基培养至对数生长期,用 PBS 将细胞数调整为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, $0.2 \text{ mL}/\text{只}$,接种于小鼠右侧腋下。

1.2.2 分组及给药。于接种肿瘤后次日,将小鼠随机分 2 组,即模型组(M 组)和短肽 HFDT1 给药组(HFDT1 组),每组 6 只。模型组给予生理盐水灌胃($20 \text{ mL}/\text{kg}$, 1 次/d);HFDT1 组给予人工合成短肽 HFDT1($7.8 \text{ mg}/\text{kg}$, $10 \text{ mL}/\text{kg}$, 1 次/d)腹腔注射,连续 10 d 给予药物处理。

1.2.3 肝脏样本的收集与处理。于末次给药 24 h 后,颈椎脱

臼处死所有小鼠,取肝脏组织置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。试验前室温解冻,取肝脏 0.1 g ,加入 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液进行匀浆, $12\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$,取上清液。经浓缩、冷冻干燥后得冻干粉。加 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,涡旋混匀, $12\,000 \text{ r}/\text{min}$ 低温离心 10 min ,取上清液,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,待 $^1\text{H NMR}$ 检测分析。

1.2.4 核磁数据处理与分析。在 Topspin 软件中对小鼠肝脏代谢组学原始图谱进行处理,并将归一化后数据录入 SIMCA-P13.0 软件中进行主成分分析(PCA)及偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),考察肝脏样本总体代谢谱图分布状况。为使组间差异最大化,利于寻找组间差异性代谢物,采用正交最小二乘法判别分析法(OPLS-DA)对数据进行分析,所有的分析结果均以得分图表示。最终根据多元分析结果,结合 HMDB 数据以及相关文献,初步确定短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠肝脏作用的差异性代谢物,并对其进行生理解释。

2 结果与分析

2.1 模型组与短肽 HFDT1 组小鼠肿瘤形态学观察 颈椎脱臼处死小鼠后,无菌收集小鼠肿瘤置于培养皿中,拍照。如图 1 所示,模型组肿瘤颜色鲜红且体积较大,HFDT1 组与模型组相比,肿瘤体积明显缩小。这表明成功复制了课题组前期研究结果——短肽 HFDT1 能够抑制肿瘤的生长^[8-9]。

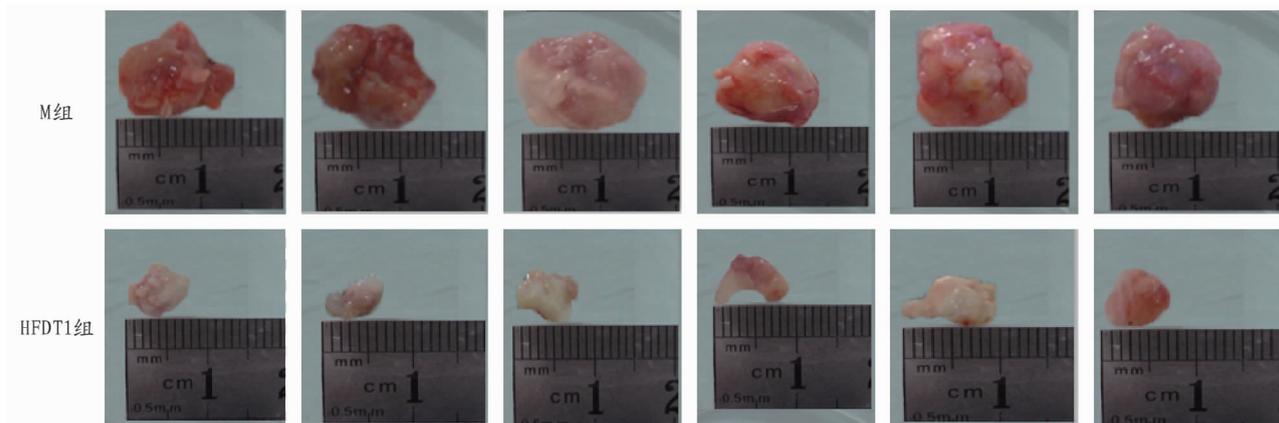


图 1 模型组与 HFDT1 组小鼠肿瘤照片

Fig.1 Tumor photos of mice in model group and HFDT1 group

2.2 短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠代谢组学研究

2.2.1 多元数据分析。首先进行 PCA 分析,该数学模型可以从整体上观察 2 组间的分类趋势和离散点。如图 2 所示,每一个点代表 1 个样本,模型组(M 组)与 HFDT1 组虽然有分离趋势,但样本离散程度较大。

由 PLS-DA 得分图(图 3A)可以看出,2 组间样本表现出一定的聚类现象。在 PLS-DA 模型成立的基础上,对原始数据建立 200 次排列试验(图 3B),结果显示随机变量 Y 变量产生的 R^2 、 Q^2 均小于原始值,表明该模型有效可靠。为凸显组间差异,提高模型的准切性和预测能力,以便找出贡献于组间分离的主要差异性物质,使用 OPLS-DA 分析方法对数据进行进一步的分析。

由 OPLS-DA 得分图(图 4A)可以看出,模型组与 HFDT1

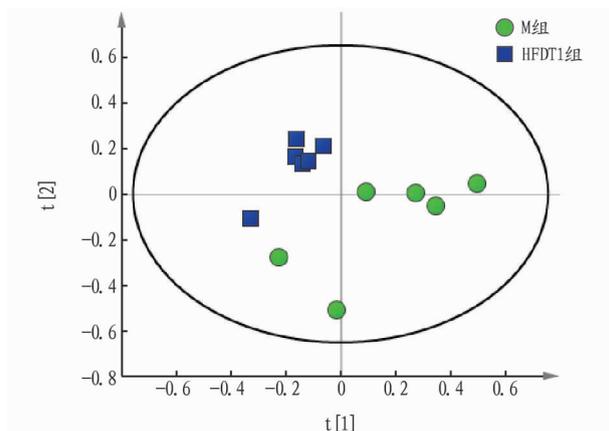


图 2 小鼠肝脏 $^1\text{H NMR}$ 图谱 PCA 得分

Fig.2 PCA score plots based on $^1\text{H NMR}$ of liver samples

组之间样本距离较远,组内样本聚类现象明显。模型验证结果表明,该模型具有良好的预测能力,且不存在过度拟合。此外,相应的三维得分图(图4B)显示,模型组与HFDT1组

沿 $t[1]$ 轴方向分离,各组内样本表现出聚类现象。基于以上的数据分析结果,提示短肽 HFDT1 组与模型组小鼠体内存在代谢差异。

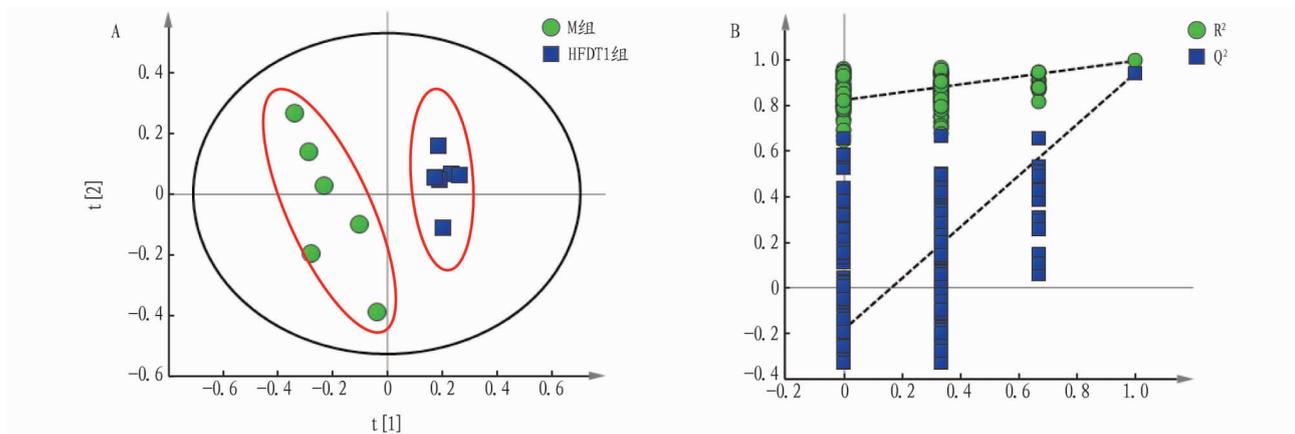


图3 小鼠肝脏 ^1H NMR 图谱 PLS-DA 得分(A)及 200 次排列试验结果(B)

Fig.3 PLS-DA score plots and corresponding permutation plots based on ^1H NMR of liver samples

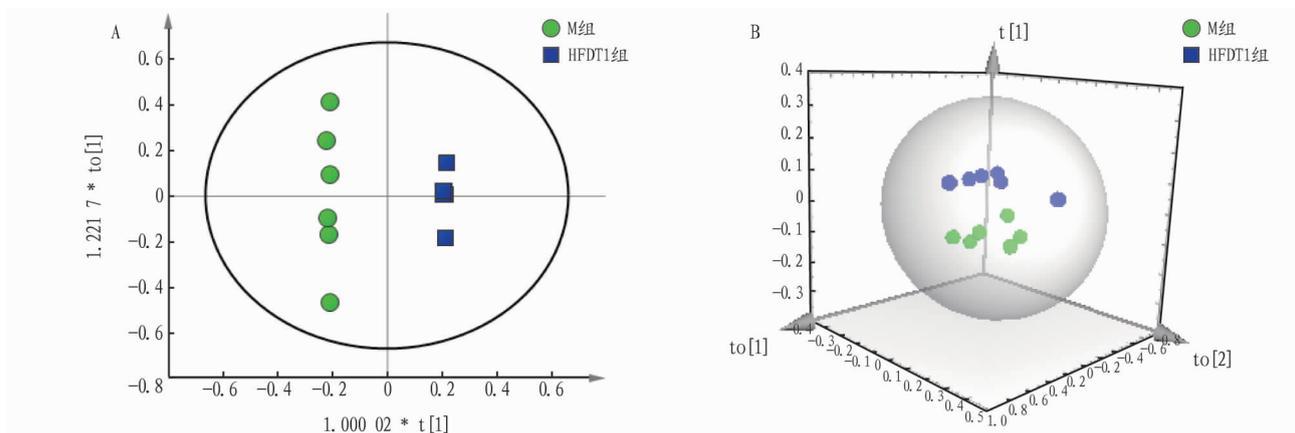


图4 小鼠肝脏 ^1H NMR 图谱 OPLS-DA 得分(A)及 3D 得分(B)

Fig.4 OPLS-DA score plots and corresponding 3D plots based on ^1H NMR of liver samples

2.2.2 差异代谢物的确定。根据多元分析结果,比对 HMDB 数据库及参考相关文献,筛选出模型组与短肽 HFDT1 组之间具有显著性差异的代谢物。如表 1 所示,与模型组相比,小鼠肝脏中共筛选出 7 种差异性代谢物,除丙酮酸 (pyruvate) 外,磷脂酰胆碱-NCH₂ (phosphatidylcholine-NCH₂)、甘

油磷酸胆碱 (glycerol phosphatidylcholine, GPC)、酪氨酸 (tyrosine)、肝糖 (glycogen)、肌苷 (inosine) 及烟酰胺 (niacinamide) 水平均在 HFDT1 组显著上调。这些代谢物分别涉及糖酵解、酪氨酸代谢、烟酰胺代谢、核苷酸代谢及胆碱磷酸化代谢通路。

表 1 小鼠肝脏中差异代谢物汇总

Table 1 Summary of differential metabolites in liver of mice

序号 No.	代谢物 Metabolites	位移值 Displacement value// ppm	变化趋势 Changing trend	代谢通路 Metabolic pathway
1	磷脂酰胆碱-NCH ₂	3.81	↑	胆碱磷酸化
2	甘油磷酸胆碱	3.69	↑	
3	酪氨酸	3.93	↑	酪氨酸代谢
4	丙酮酸	2.41	↓	糖酵解
5	肝糖	5.41;3.60	↑	
6	烟酰胺	8.94;8.72	↑	烟酰胺代谢
7	肌苷	6.10	↑	核苷酸代谢

注: ↑表示与模型组相比, HFDT1 组水平升高; ↓表示与模型组相比, HFDT1 组水平下降

Note: ↑ compared with the model group, the level of the HFDT1 group was increased; ↓ compared with the model group, the level of the HFDT1 group was decreased

3 讨论

胃癌是一种代谢性疾病,在癌细胞的增殖和侵袭过程中,机体代谢网络会发生紊乱,其代谢产物也会随之产生变化^[10]。

课题组之前的试验证明,短肽 HFDT1 具有抗肿瘤作用^[8-9],但其作用机制尚未完全揭示。故该试验尝试通过¹H NMR代谢组学技术,探究短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠体内代谢的影响,揭示其可能的代谢通路,探索其抗肿瘤作用。该研究发现短肽 HFDT1 对肿瘤细胞的生长具有比较明显的抑制作用,其抗肿瘤作用机制可能与调控涉及糖酵解、酪氨酸代谢、核苷酸代谢、烟酰胺代谢及胆碱磷酸化代谢通路关系密切。

3.1 糖酵解 许多研究证实,即使在氧充足条件下,肿瘤细胞也仍然以糖酵解为主要的供能方式,即有氧糖酵解—Warburg 效应^[11]。低氧条件下,肿瘤细胞大量摄取葡萄糖,由糖酵解生成的丙酮酸经乳酸脱氢酶转化为乳酸,为其自身的分化与增长提供能量。丙酮酸为糖酵解过程和 TCA 循环的关键中间枢纽点,在机体发生能量代谢紊乱时,丙酮酸的水平会出现异常增加。研究显示^[12],临床四期胃癌患者血清丙酮酸水平异常增高。Zhang 等^[13]基于¹H NMR 代谢组学技术发现患者胃癌组织中丙酮酸含量呈现高水平表达。该试验小鼠肝脏中丙酮酸含量在给予短肽 HFDT1 治疗后显著下调,同时肝糖水平显著升高,提示短肽 HFDT1 可以抑制糖酵解速率,减少肿瘤细胞的能量供给,减缓肿瘤细胞的生长速度。

3.2 烟酰胺代谢 有研究表明,烟酰胺在肿瘤患者血浆中低表达,烟酰胺可以通过促进 *RUNX3* 基因的表达,从而抑制人膀胱肿瘤移植瘤及致癌原诱导的鼠膀胱肿瘤的生长速度^[14-15]。该试验中, HFDT1 组烟酰胺水平显著升高,提示 HFDT1 可能通过提高烟酰胺水平,促使 *RUNX3* 基因的表达,抑制小鼠胃癌细胞的生长与增殖。

3.3 核苷酸代谢 肿瘤细胞处于快速增殖和分化状态,核苷酸合成和代谢频率明显升高;在胃癌患者或动物模型中,以核苷酸分解代谢产物尿酸或尿酸盐的积累为主要特征^[10]。有文献报道^[16],肌苷在体内参与细胞的能量代谢和蛋白质的合成,提高相关代谢酶的活性,发挥保护细胞作用,并作为在细胞缺氧条件下产生 ATP 的替代能量来源。此外,肌苷还具有抗氧化应激的作用^[17]。Nie 等^[18]基于 UHPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术发现与胃癌裸鼠模型组相比,改良后四君子汤治疗组裸鼠血浆中肌苷水平显著增加。该试验中,在给予短肽 HFDT1 治疗后,小鼠肝脏中的肌苷水平显著上升,与上述文献报道结果一致。试验结果提示短肽 HFDT1 可能通过抑制肌苷分解速率,增加肌苷含量,恢复低能缺氧状态下细胞的正常代谢,减轻机体的氧化应激损伤。

3.4 酪氨酸代谢 在肿瘤代谢组学的研究中,多种氨基酸被认为是有助于研究多种恶性肿瘤的潜在生物标志物^[19]。根据文献报道,肿瘤细胞为满足自身急剧增长的蛋白质合成需求,需要在癌症病灶周围累积足够的芳香族氨基酸,如酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸等^[20]。该试验中, HFDT1 组酪氨酸水平明显上调,这一结果可能与短肽 HFDT1 抑制肿瘤细胞的

增长与分化,导致体内酪氨酸的大量堆积有关。

也有研究发现,胃癌患者血浆中酪氨酸含量异常减少^[21],这可能是机体代偿反应的作用结果,同时也说明酪氨酸代谢在肿瘤中的作用有待进一步深入研究。

3.5 胆碱磷酸化 肿瘤中胆碱磷酸化的紊乱通常伴随着含胆碱代谢物的改变,其中,在多种癌症患者中磷酸胆碱(PC)和 GPC 水平增加得到了广泛报道^[22]。胆碱、PC 和 GPC 在胆碱磷酸化过程中可相互转化,对细胞膜的生物合成与降解有非常重要的意义。该研究中,与模型组相比, HFDT1 组小鼠肝脏中磷脂酰胆碱-NCH₂ 和 GPC 含量呈现上升趋势,提示生物膜的合成需求升高,这一需求可能是为了满足肝脏的自身修复。结果表明短肽 HFDT1 可能通过调节胆碱磷酸化,起到修复受损细胞膜的作用。

4 结论

该研究基于 NMR 代谢组学方法,分析了 MFC 荷瘤小鼠模型组与短肽 HFDT1 给药组肝脏的代谢组特征以及组间的代谢组差异,发现 MFC 荷瘤小鼠给药后,肝脏中涉及糖酵解、酪氨酸代谢、核苷酸代谢、烟酰胺代谢及胆碱磷酸化代谢通路的多种代谢物水平异常变化,这些代谢通路的变化可能是短肽 HFDT1 的作用结果,初步揭示了其抗肿瘤作用与调节机体代谢紊乱密切相关。此外,该研究也提示代谢组学技术可以从整体上评价分析药物的作用机制,有可能为抗癌药物的筛选与研发提供了新思路。

该试验初步揭示了短肽 HFDT1 对 MFC 荷瘤小鼠抗肿瘤作用,在后续研究中,可考虑采用动态观察代谢物变化(多个时间点采样)及结合其他技术,如与 LC/MS、蛋白质组学联用等,从多方面、多角度更加深入探究短肽 HFDT1 抗肿瘤的作用机制。

参考文献

- [1] MOLINA-CASTRO S, PEREIRA-MARQUES J, FIGUEIREDO C, et al. Gastric cancer: Basic aspects [J]. *Helicobacter*, 2017, 22(S1): 26-29.
- [2] STRONG V E, WU A W, SELBY L V, et al. Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China [J]. *J Surg Oncol*, 2015, 112(1): 31-37.
- [3] 曹慧娟, 李君, 孙淑军, 等. 黄芩素对人肺腺癌 A549 细胞的药效作用及机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(2): 98-103.
- [4] REN S C, SHAO Y P, ZHAO X J, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals major metabolic pathways and potential biomarker involved in prostate cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(1): 154-163.
- [5] 王高玉, 刘红宁, 戈淑超, 等. 铁石石斛水提物对胃癌前病变作用的尿液代谢组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 77-85.
- [6] 高鹏飞, 刘卫红, 吴俊珠, 等. 代谢组学在中医药研究中的应用进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21): 284-288.
- [7] BECKONERT O, KEUN H C, EBBELS T M D, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts [J]. *Na Protoc*, 2007, 2(11): 2692-2703.
- [8] 常旭, 王聪, 欧红利, 等. 美洲大蠊多肽对 MFC 荷瘤小鼠免疫影响的初步探究 [J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(7): 564-569.
- [9] 江伦, 郑晓坤, 陈泽锋, 等. 美洲大蠊多肽对 MFC 荷瘤小鼠外周血淋巴细胞的影响 [J]. *大理大学学报*, 2019, 4(4): 31-35.
- [10] XIAO S Y, ZHOU L Y. Gastric cancer: Metabolic and metabolomics perspectives [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1): 5-17.
- [11] MA H, HASIM A, MAMTIMIN B, et al. Plasma free amino acid profiling of esophageal cancer using high-performance liquid chromatography spectroscopy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(26): 8653-8659.
- [12] IKEDA A, NISHIUMI S, SHINOHARA M, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(5): 548-558.

苗床上,播后用细土、草木灰或充分腐熟的精细农家肥 1.0:0.5 覆盖 1 cm,浇水浸透,常保持苗床湿润。5~6 片真叶时移栽,每穴 2~3 株,将苗根茎部齐泥栽入种植穴压实,略低于厢面 1.5 cm,点穴浇施定根水。

4.3 田间管理

4.3.1 灌溉施肥与除杂。锦屏苦苣菜播种后要保持土壤湿润,苗后生长缓慢,遇干旱时要及时浇水和人工拔除杂草。移栽成活或定苗后及时施 1 次提苗肥尿素 75~112.5 kg/hm²,以后每刈割 1 次追施 1 次。

4.3.2 病虫害防治。锦屏苦苣菜主要病害为锈病,发生时可用 25% 粉锈宁可湿性粉剂喷洒,每 7 d 喷洒 1 次,连续 3 次或选择晴天刈割利用。主要虫害为蚜虫^[8],发生时选用 50% 的抗蚜威可湿性粉剂 1 000~1 500 倍液喷洒,每 7 d 喷洒 1 次,连续 3 次或用黄板诱杀。

5 利用技术

5.1 刈割利用 锦屏苦苣菜属叶菜类优质饲草,适口性好,猪、兔、鹅、鸡、鱼等畜禽喜食,株高 50~60 cm 时,进行第 1 次刈割,留茬 5~10 cm,之后每隔 30~40 d 刈割 1 次,最后 1 次齐地面割完。每次刈割后,追施复合肥 150~225 kg/hm² 或农家肥以提高产量。可整喂不必切碎喂,也可切碎与其他精料拌匀后饲喂,宜随割随喂^[9]。

5.2 剥叶利用 定植 30~40 d 即可剥叶利用,每株每次剥叶 3~5 片,留 4~5 片叶子继续生长,以后每 8~10 叶时剥叶 1 次。为了提高全年饲草供应的均衡性,宜采取分期播种。

5.3 青贮利用 苦苣菜草质柔软,青贮时应压实,青贮后呈黄色,具芳香气味,有微酸味^[10],青贮料营养物质与鲜草相

似,青贮时因草质嫩、水分高,宜与禾本科牧草混合青贮,青贮时先晾晒 3~5 h,待水分含量降至 60%~70% 时效果更好。

5.4 留种 留种地块宜在 5 或 8 月份以后停止刈割或摘叶利用,由于锦屏苦苣菜花期长(2 个月以上),种子成熟不一致,存在种子成熟即飞落现象,小面积生产可在盛花 5~10 d 后用尼龙种子袋套住整株种穗,防止飞种,成熟 90% 时可连种子袋一起收割晾晒。大面积留种可在种子 60%~70% 成熟时,一般为花后 21 d 左右 1 次性收割,及时晾晒、清选和入库。

6 适宜区域

锦屏苦苣菜适应性广,适宜贵州丘陵山地、中低山地区及我国长江以南、亚热带中低海拔相似气候区种植。

参考文献

- [1] 陈宝书. 牧草饲料作物栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 400.
- [2] 贾慎修. 中国饲用植物志: 第 2 卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 1985: 267-272.
- [3] 谢彩云, 范国华, 莫志萍. 锦屏苦苣菜品种比较试验报告[J]. 当代畜牧, 2019(9): 29-31.
- [4] 牟琼, 吴佳海, 杨义成, 等. 花溪灰萝卜品种比较试验[J]. 种子, 2011, 30(2): 80-82.
- [5] 王应芬, 牟琼, 李娟, 等. 饲草新品种花溪苕菁甘蓝的选育及栽培技术[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(3): 120-123.
- [6] 黄梅芬, 罗在仁, 钟绍丽, 等. 适宜在中国南方热区种植的优良饲料——滇西翅果菊[J]. 热带农业科学, 2018, 38(6): 64-68.
- [7] 周煜钧, 敖礼林, 宋孝才, 饶卫华. 饲用苦苣菜丰产高效栽培技术[J]. 科学种养, 2018(4): 28-29.
- [8] 吴旭江, 吕文君, 陈银根, 等. 苦苣菜设施栽培技术[J]. 福建农业科技, 2015(10): 46-47.
- [9] 宋恒. 凉山州苦苣菜栽培与利用技术[J]. 畜禽业, 2015(3): 54.
- [10] 黄诗伟. 优质牧草苦苣菜栽培与利用技术[J]. 四川畜牧兽医, 2011(5): 35.
- [13] ZHANG H L, CUI L Z, LIU W, et al. ¹H NMR metabolic profiling of gastric cancer patients with lymph node metastasis[J]. Metabolomics, 2018, 14(4): 1-13.
- [14] 王维嘉, 杜鹃, 赵春临. 基于超高效液相-质谱联用技术的胃癌患者血浆代谢组学研究[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(1): 41-46.
- [15] KIM W J, LEE J W, QUAN C, et al. Nicotinamide inhibits growth of carcinogen induced mouse bladder tumor and human bladder tumor xenograft through up-regulation of RUNX3 and p300[J]. J Urol, 2011, 185(6): 2366-2375.
- [16] MÓDIS K, GERŐ D, STANGL R, et al. Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(2): 437-446.
- [17] GUDKOV S V, SHTARKMAN I N, SMIRNOVA V S, et al. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice[J]. Radiat Res, 2006, 165(5): 538-545.
- [18] NIE S S, ZHAO Y H, QIU X J, et al. Metabolomic study on nude mice models of gastric cancer treated with modified Si Jun Zi Tang via HILIC UHPLC-Q-TOF/MS analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019(3): 1-18.
- [19] JING F Y, HU X, CAO Y F, et al. Discriminating gastric cancer and gastric ulcer using human plasma amino acid metabolic profile[J]. IUBMB Life, 2018, 70(6): 553-562.
- [20] DENG K, LIN S R, ZHOU L Y, et al. High levels of aromatic amino acids in gastric juice during the early stages of gastric cancer progression[J]. PLoS One, 2012, 7(11): 1-10.
- [21] WIGGINS T, KUMAR S, MARKAR S R, et al. Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: A systematic review[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2015, 24(1): 32-38.
- [22] GU J P, HU X M, SHAO W, et al. Metabolomic analysis reveals altered metabolic pathways in a rat model of gastric carcinogenesis[J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 60053-60073.

(上接第 91 页)