

基于细胞代谢组学的商陆皂苷甲诱导HKC细胞损伤的机制研究

张 丛, 刘传鑫, 王铭爽, 何 涛, 王文鑫, 张 丹, 崔曦兮, 袁付丽, 黄建梅*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 基于细胞代谢组学技术, 考察商陆皂苷甲(EsA)诱导人肾小管上皮HKC细胞损伤前后对细胞代谢产物的影响, 寻找潜在的生物标志物。方法 MTT法检测EsA 0(对照组)、0.125、0.250、0.500、0.750、1.000 mmol/L对HKC细胞活力的影响; 试剂盒法检测EsA 0(对照组)、0.25、0.75 mmol/L对HKC细胞上清LDH含量的影响, 明确EsA肾细胞毒性; 利用UPLC-Q/TOF-MS分析技术, 将EsA 0(对照组)、0.25、0.75 mmol/L作用24 h的HKC细胞进行代谢组学分析, 采用Progenesis Q1软件进行数据处理, 将得到的数据导入SIMCA-P12.0 software进行多元统计分析, 利用主成分分析(PCA)剔除离群值, 进行正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)得到变量权重值(VIP), 选取VIP>1的差异代谢物, 进行检验, 获得具有统计学意义的生物标志物。通过HMDB、KEGG、METLIN等代谢物数据库对生物标记物进行鉴定, 利用MetPA平台对进行代谢通路分析。结果 与对照组比较, EsA在大于0.25 mmol/L时对HKC细胞活力有显著的抑制作用($P<0.05$ 、 0.01); 细胞上清液中LDH含量显著上升($P<0.05$)。通过代谢组学技术和相关数据库分析筛选出了15个生物标志物, 主要涉及甘油磷脂代谢、嘧啶代谢、鞘脂代谢、氨基酸代谢和能量代谢途径。结论 EsA可诱导肾细胞损伤, 可能与氧化应激损伤, 氨基酸代谢失调, 能量代谢异常以及脂质代谢紊乱相关。

关键词: 商陆皂苷甲; 细胞代谢组学; 肾损伤; HKC细胞; 生物标志物; 氧化应激损伤; 氨基酸代谢失调; 能量代谢异常; 脂质代谢紊乱

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)03-0443-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.03.013

Mechanism research of HKC cell injury induced by esculentoside A based on cell metabolomics

ZHANG Cong, LIU Chuanxin, WANG Mingshuang, HE Tao, WANG Wenxin, ZHANG Dan, CUI Xixi, YUAN Fuli, HUANG Jianmei

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Esculentoside A (EsA) on cellular metabolites before and after injury of human renal tubular epithelial HKC cells, and to find potential biomarkers based on cell metabolomics techniques. **Methods** MTT method was used to detect the effect of EsA 0 (control group), 0.125, 0.250, 0.500, 0.750 and 1.000 mmol/L on the activity of HKC cells; Kit method was used to detect the effect of EsA 0 (control group), 0.25 and 0.75 mmol/L on the content of LDH in the supernatant of HKC cells, so as to determine the nephrotoxicity of EsA; By using UPLC-Q/TOF-MS analysis technology, the HKC cells treated with EsA 0 (control group), 0.25 and 0.75 mmol/L for 24 hours were analyzed by metabolomics. The data were processed by Progenesis Q1 software and imported into SIMCA-P12.0 Software carries on multivariate statistical analysis, uses PCA to eliminate outliers, carries on OPLS-DA to obtain variable weight value (VIP), selects VIP > 1 differential metabolite, carries on the test, obtains the biomarker with statistical significance. Biomarkers were identified by HMDB, KEGG, metlin and other metabolite databases, and metabolic pathways were analyzed by metpa platform. **Results** After stimulation with EsA, HKC cells showed a decrease in cell viability ($P < 0.05$) and up-regulation of LDH in cell supernatant ($P < 0.05$), 15 biomarkers were screened by metabolomics technology and related database analysis, mainly related to glycerophospholipid metabolism, pyrimidine metabolism, sphingolipid metabolism, amino acid metabolism and energy metabolism pathway. **Conclusion** EsA can induce renal cell injury, may be associated with oxidative stress damage, amino acid metabolism disorders, abnormal energy metabolism, and lipid metabolism disorders.

收稿日期: 2019-11-04

第一作者: 张 丛(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向为细胞代谢组学。E-mail: zhangc581@163.com

*通信作者: 黄建梅(1970—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药体内过程分析。E-mail: huangjm@bucm.edu.cn

Key words: Esculentoside A; cell metabolomics; renal injury; HKC cells; biomarkers; oxidative stress damage; amino acid metabolism disorders; abnormal energy metabolism; lipid metabolism disorders

中药作为一种天然且宝贵的资源,具有来源广泛,价格低廉以及疗效良好等特点,然而,近年来,随着中药的广泛应用,国内外关于中药引起不良反应的报道逐渐增多,中药的安全问题受到了社会的广泛关注,中药毒性成为制约中药现代化发展的重要因素^[1-2]。商陆为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 或垂序商陆 *Phytolacca americana* L. 的干燥根^[3],始载于《神农本草经》,是收藏在历届药典中的传统中药,具有消肿散结、止咳平喘等功效^[4]。商陆皂苷甲(EsA)是从传统中药商陆中提取的一种三萜皂苷类化合物,是商陆主要的活性成分。已有大量文献证实中药商陆在使用中具有一定的不良反应,其中肾毒性尤为严重^[5-6],周倩等^[7]研究发现,EsA可致肾细胞毒性。然而,关于EsA致肾毒性研究尚不全面,仍有待进一步的深入研究。

中药肾毒性监测缺乏安全、高效的技术体系,亟需新兴技术的引入,此外毒理机制研究也需要多学科交叉融合。代谢组学是组学技术的重要分支^[8],是通过考察生物体受到外界扰动前后代谢产物的变化情况来反应生物体内代谢情况的一种技术^[9]。细胞代谢组学主要着眼于细胞内、外复杂的代谢产物变化情况^[10],已应用于毒理学^[11]、药效评价^[12]等多个领域,其基于内源性代谢物的整体研究策略,与中药“多组分、多靶点、整体调节”的作用特点相吻合,且在毒性标志物发现及毒性评价方面具有独到优势。

基于上述研究现状,本实验利用细胞代谢组学技术,筛选出肾毒性相关的生物标志物,并进行通路分析,找寻与肾毒性相关的代谢通路。本研究结果可为后期EsA毒性作用机制研究提供科学依据,并为其他中药毒性研究提供一定的参考。

1 材料

1.1 细胞

人肾小管上皮细胞系HKC,购于北京协和细胞中心。

1.2 药物及主要试剂

商陆皂苷甲标准品(上海源叶生物有限公司,批号P09M10S87832,质量分数99.9%);PBS缓冲液、DMEM/F12培养基(美国Corning公司);胎牛血清(四季青公司);青霉素-链霉素抗体、0.25%胰酶(美国Gibco公司);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南

京建成生物工程研究所);MTT(拜尔迪生物技术公司);DMSO(Simga-Aldrich);甲酸、乙腈(色谱纯,Thermo Fisher公司)。培养基配置:DMEM/F12+10%胎牛血清+1%双抗。

1.3 主要仪器

ACQUITY UPLC I-CLASS超高效液相色谱仪、SYNAPT G2-Si Q-TOF质谱仪(美国Waters公司);JA2003B电子天平(上海越平科学仪器有限公司);高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Milli-Q Advantage(美国Millipore公司);CO₂细胞培养箱(美国Fisher Scientific公司);倒置显微镜(日本Nikon公司);酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 MTT法检测HKC细胞活力

将处于对数生长期的HKC细胞经0.25%胰酶消化后制备成细胞悬液,以 1×10^4 /mL的密度接种于96孔板,每孔100 μ L。孵育24 h后,分别以0(对照组)、0.125、0.250、0.500、0.750、1.000 mmol/L EsA作用于HKC细胞,每组平行5孔,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μ L。继续孵育4 h后,吸出每孔中的培养基,每孔加入150 μ L DMSO溶液,振荡10 min至完全溶解。用酶标仪在490 nm处测定吸光度(A)值。实验重复3次。计算HKC细胞的存活率。

$$\text{HKC细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 HKC细胞上清LDH含量测定

将处于对数生长期的HKC细胞经0.25%胰酶消化后制备成细胞悬液,以 1×10^4 /mL的密度接种于96孔板,每孔100 μ L。孵育24 h后,分别以0(对照组)、0.25、0.75 mmol/L EsA作用于HKC细胞24 h,每组平行5孔,实验重复3次。利用LDH试剂盒检测细胞上清中LDH的含量。

2.3 细胞代谢组学样品制备

参考文献^[13],取处于对数生长期的HKC细胞接种于6孔板中,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后,分别以0(对照组)、0.25、0.75 mmol/L EsA作用于HKC细胞,每组设置8个平行组,作用24 h后停止孵育。6孔板中的HKC细胞用PBS漂洗后,加入-80 $^{\circ}$ C甲醇淬灭2次,采用反复冻融的方法,使其充分破碎,将样品收集到2 mL EP管中,4 $^{\circ}$ C,13 000 r/min离心15 min。取细胞样品上

清液至新的2 mL EP管中作为待测样本。所有样本利用N₂吹干,吹干的样品用200 μ L 50%甲醇复溶,涡旋混匀1 min,并在4 $^{\circ}$ C,13 000 r/min条件下离心15 min,取上清液,UPLC-Q/TOF-MS进样分析。

2.4 QC样品的制备

各吸取10 μ L待测细胞样品于离心管中混合,处理方法和“2.3”项一致,制备成QC样品,平行制备6份用于方法学考察。

2.5 色谱条件

本实验将细胞样品以0.3 mL/min的体积流量进样,采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μ m)色谱柱,选取0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B)为流动相;梯度洗脱条件设置为:0~0.5 min 99%A;0.5~2.0 min 99%~50%A;2~10 min 50%~1%A;10~12 min 1%~99%A,柱温45 $^{\circ}$ C,进样量5 μ L。

2.6 质谱条件

本研究采用电喷雾电离源(ESI源),分别在正、负离子模式下进行质谱检测分析,为确保得到的质谱信息更全面,将扫描范围设置为: m/z 50~1 000,毛细管电压:3.5 kV(ESI⁺),3.0 kV(ESI⁻),锥孔电压为40 V,脱溶剂气体选用氮气,将脱溶剂气体体积流量设置为600 L/h(温度325 $^{\circ}$ C),锥孔气体体积流量设置为50 L/h,碰撞能量为20~40 eV。

2.7 方法学考察

对仪器精密度、方法精密度和样品稳定性进行考察。仪器精密度为同一QC样品连续进样6次,分别计算峰面积和保留时间的RSD值。方法精密度为平行制备6份QC样品,连续进样分析,分别计算峰面积和保留时间的RSD值。样品稳定性为同一QC样品溶液,分别在0、2、4、8、12 h进样分析,分别计算峰面积和保留时间的RSD。

仪器精密度试验同一样品连续进样后,在得到的色谱图中,随机选取20个色谱峰,计算保留时间和峰面积的RSD值。结果显示,在正、负离子模式下保留时间的RSD均小于0.3%,峰面积的RSD均小于8.6%,表明仪器精密度良好。

方法精密度试验平行样品进样后,在得到的色谱图中,随机选取20个色谱峰,计算保留时间和峰面积的RSD值,结果显示在正、负离子模式下保留时间的RSD均小于0.5%,峰面积的RSD均小于12.0%,表明方法精密度良好。

样品稳定性试验同一样品在不同时间进样后,在得到的色谱图中,随机选取20个色谱峰,计算保

留时间和峰面积的RSD值,结果显示保留时间的RSD均小于1.0%,峰面积的RSD均小于12.0%,表明样品稳定性良好。

2.8 数据处理

采用SPSS 17.0软件对计数资料数据进行数理统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

采用Progenesis QI软件进行数据处理,包括峰提取、峰对齐、峰匹配和归一化等处理,将得到的数据导入SIMCA-P12.0 software(Umetrics AB, Umea, Sweden)进行多元统计分析。利用主成分分析(PCA)剔除离群值,进行正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)得到变量权重值(VIP),选取VIP>1的差异代谢物,进行正态性检验,符合正态分布的采用T检验;不符合正态分布的数据进行Kruskal-Wallis非参数检验,以获得具有统计学意义的生物标志物($P<0.05$)。通过HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)、KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)、METLIN(<https://metlin.scripps.edu/>)等代谢物数据库对这些生物标记物进行物质鉴定。最后,利用MetPA(<http://metpa.metabolomics.ca/MetPA/faces/Home.jsp>)平台对所获得的标志物进行代谢通路分析,以获得EsA诱导HKC细胞毒性的相关代谢通路。

3 结果

3.1 MTT法检测EsA对HKC细胞活力的影响

以对照组细胞存活率(100%)为参照,EsA在大于0.25 mmol/L时对HKC细胞活力有显著的抑制作用($P<0.05$ 、 0.01),随着剂量的增加,细胞存活率逐渐降低,呈现剂量相关性(见表1),经计算,在EsA剂量为0.6 mmol/L时,达到了半数致死剂量。

表1 不同浓度EsA对HKC细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 1 Effect of different concentrations of EsA on HKC cell viability ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	浓度/(mmol $\cdot$ L ⁻¹)	存活率/%
对照	—	100
EsA	0.125	93.70 $\pm$ 5.02
	0.250	83.89 $\pm$ 2.46*
	0.500	58.73 $\pm$ 3.91*
	0.750	32.72 $\pm$ 4.10**
	1.000	16.25 $\pm$ 4.87**

与对照组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.2 EsA对HKC细胞上清液LDH含量的影响

与对照组比较, 0.50、0.75 mmol/L 组的细胞LDH释放量发生了显著性的提升($P<0.05$ 、 0.01), 而0.25 mmol/L 组的变化不明显。见表2。

3.3 代谢组学数据处理

利用UPLC-Q/TOF-MS分析技术, 将获得的HKC细胞进行代谢组学分析, 为了保证样品的稳定

表2 EsA对HKC细胞中LDH含量的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of EsA on LDH content in HKC cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)
对照	—	75.56±5.98
EsA	0.25	96.97±4.71
	0.5	120.76±1.40*
	0.75	140.07±6.42**

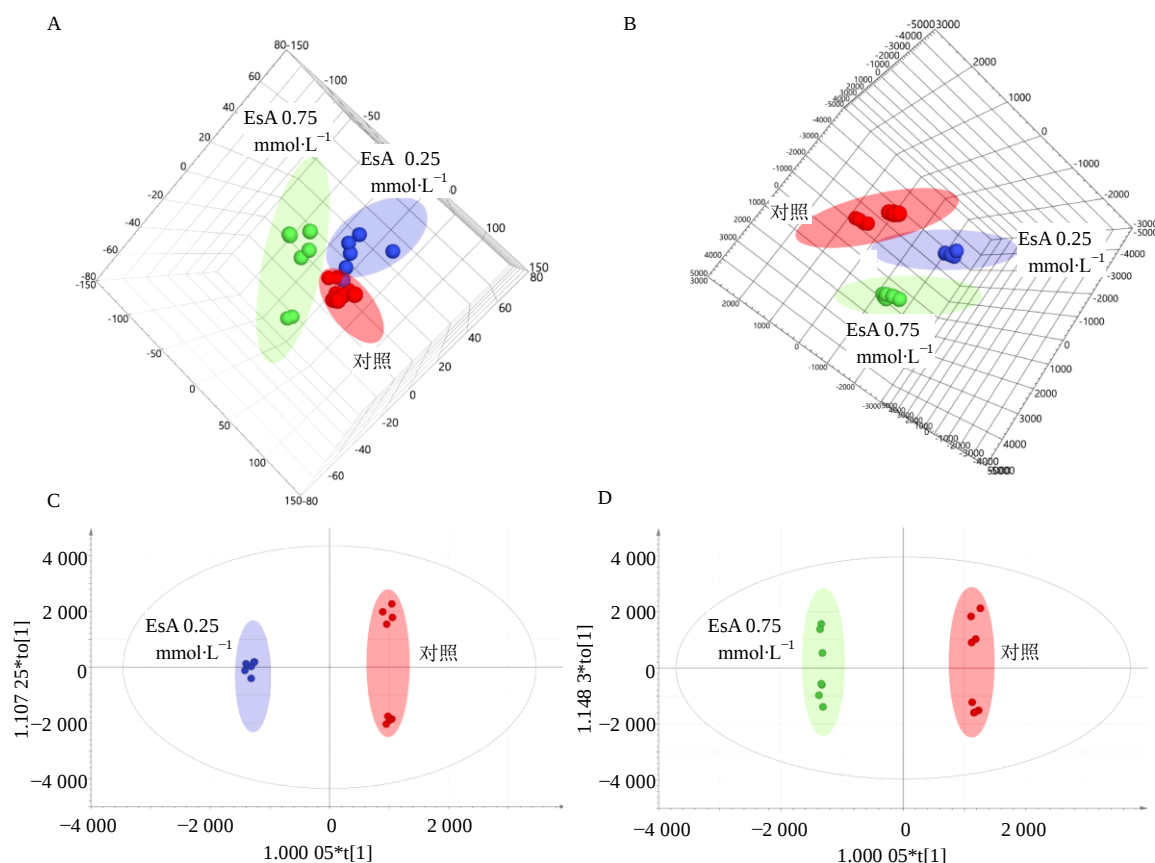
与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

性和分析结果的可靠性, 采用多元统计分析用于HKC细胞样品代谢组学研究, 常用的多元统计分析有PCA和OPLS-DA。本实验中, 正离子和负离子模式下的PCA和OPLS-DA得分图(图1、2)均显示了对照组、EsA 0.25、0.75 mmol/L 3组之间出现了明显的成簇聚集。在OPLS-DA模型中 R^2 和 Q^2 用于评价模型的真实性和预测能力, R^2 和 Q^2 都小于1且两个参数值接近1时, 表示所建立的模型较好^[14]。本实验中建立的OPLS-DA模型中, R^2 和 Q^2 均符合要求, 如图1、2图示所示, 说明建立的模型稳定可靠, 保证了分析结果的准确度。

3.4 差异代谢物的鉴定

在OPLS-DA模型基础上, 筛选VIP>1且具有显著性差异($P<0.05$)的标志物用于进一步分析。本实验中, 潜在标志物通过MTELIN, HMDB等代谢物数据库进行比对, 在正、负离子模式下共鉴定出15个差异代谢物(表3、4)。将鉴定出的差异代谢物用MetPA平台做热点图(图3B), 由图可见, 给药

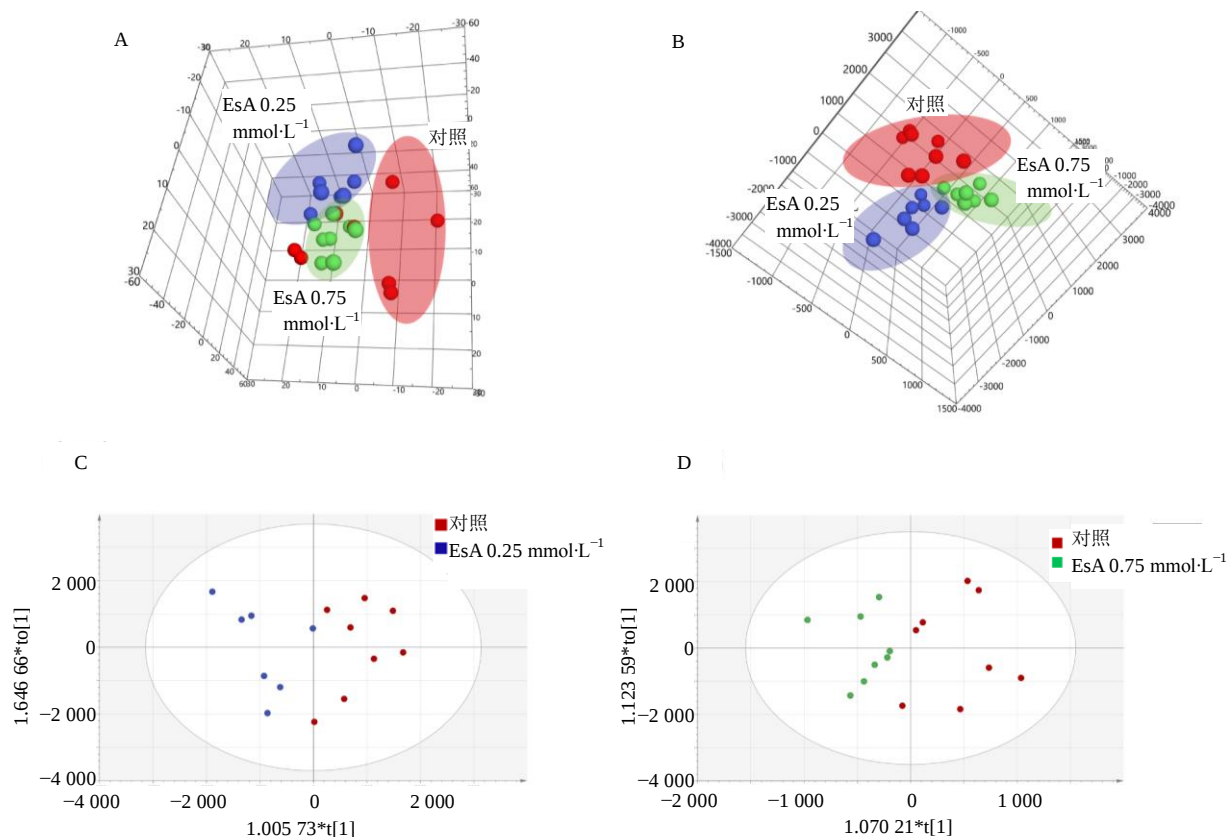


A-0.25、0.75 mmol/L EsA组与对照组的PCA得分图, $R^2X=0.705$, $Q^2=0.446$; B-0.25、0.75 mmol/L EsA组与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.938$, $R^2Y=0.998$, $Q^2=0.953$; C-0.25 mmol/L EsA与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.938$, $R^2Y=0.996$, $Q^2=0.918$; D-0.75 mmol/L EsA与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.946$, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.984$

A-PCA scores of of EsA 0.25、0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.705$, $Q^2=0.446$; B-OPLS-DA scores of EsA 0.25、0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.938$, $R^2Y=0.998$, $Q^2=0.953$; C-OPLS-DA of EsA 0.25 mmol/L group and control group score chart, $R^2X=0.938$, $R^2Y=0.996$, $Q^2=0.918$; D-OPLS-DA score map of EsA 0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.946$, $R^2Y=999$, $Q^2=0.984$.

图1 正离子模式多元统计分析图

Fig. 1 Multi-statistical analysis of positive ion mode



A-0.25、0.75 mmol/L EsA组与对照组的PCA得分图, $R^2X=0.645$, $Q^2=0.383$; B-0.25、0.75 mmol/L EsA组与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.85$, $R^2Y=0.778$, $Q^2=0.582$; C-0.25 mmol/L EsA与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.815$, $R^2Y=0.737$, $Q^2=0.582$; D-0.75 mmol/L EsA与对照组的OPLS-DA得分图, $R^2X=0.714$, $R^2Y=0.679$, $Q^2=0.341$ 。

A-PCA scores of of EsA 0.25、0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.645$, $Q^2=0.383$; B-OPLS-DA scores of EsA 0.25、0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.85$, $R^2Y=0.778$, $Q^2=0.582$; C-OPLS-DA of EsA 0.25 mmol/L group and control group score chart, $R^2X=0.815$, $R^2Y=0.737$, $Q^2=0.582$; D-OPLS-DA score map of EsA 0.75 mmol/L group and control group, $R^2X=0.714$, $R^2Y=0.679$, $Q^2=0.341$ 。

图2 负离子模式多元统计分析图

Fig. 2 Graph of multivariate statistical analysis of negative ion mode

表3 正离子模式下差异性标志物

Table 3 Identification results of differential markers in positive ion mode

序号	化合物名称	保留时间/min	化学式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	VIP值	变化趋势	组别
1	β -D-果糖-6-磷酸	6.28	$C_6H_{13}O_9P$	261.034 9	261.037 5	-9.96	1.172 7	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
2	S-甲酰基谷胱甘肽	2.64	$C_{11}H_{17}N_3O_7S$	353.110 4	353.113 1	-7.62	7.163 1	↓ *	EsA 0.25、0.75 mmol/L
3	葡萄糖神经酰胺	11.09	$C_{42}H_{81}NO_8$	728.602 8	728.604 0	-1.64	1.938 8	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
4	L-乙酰肉碱	1.22	$C_9H_{17}NO_4$	204.125 4	204.123 6	8.82	1.017 8	↓ **	EsA 0.25 mmol/L
5	磷酸硫胺素	9.64	$C_{12}H_{17}N_4O_4PS$	327.068 7	327.068 1	1.83	2.504 3	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
6	PC(15:0)	10.71	$C_{43}H_{86}NO_8P$	740.598 7	740.595 8	3.95	1.242 9	↑ **	EsA 0.75 mmol/L
7	CE(16:1)	9.11	$C_{43}H_{74}O_2$	640.606 5	640.603 3	5.02	4.423 5	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
8	PC(20:3)	11.20	$C_{44}H_{82}NO_7P$	732.566 2	732.561 8	6.01	4.631 2	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
9	LPC(20:4)	3.25	$C_{28}H_{50}NO_7P$	526.326 7	526.329 8	-5.89	1.068 3	↑ *	EsA 0.75 mmol/L
10	LPC(18:1)	5.96	$C_{26}H_{32}NO_7P$	522.356 1	522.356 0	0.19	1.507 2	↑ *	EsA 0.25、0.75 mmol/L

↑表示与对照组比较水平上升; ↓表示与对照组相比水平下降; * $P<0.05$ ** $P<0.01$

↑ Indicates an increase in level compared to control group; ↓ indicates a decrease in level compared to control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$

表4 负离子模式下差异性标志物

Table 4 Identification results of differential markers in negative ion mode

序号	化合物名称	保留时间/min	化学式	实测值 m/z	理论值 m/z	误差/ $\times 10^{-6}$	VIP 值	变化趋势	比较组别
1	2-异丙基苹果酸	10.34	$C_7H_{12}O_5$	157.049 7	157.050 1	-2.55	6.6713	↑ **	EsA 0.25、0.75 mmol/L
2	5-甲基胞嘧啶	9.73	$C_5H_7N_3O$	106.039 5	106.040 5	-9.00	5.5894	↑ *	EsA 0.25、0.75 mmol/L
3	胸苷	10.57	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	223.073 0	223.071 9	4.85	4.3368	↑ *	EsA 0.25、0.75 mmol/L
4	PE(18:1)	9.17	$C_{41}H_{80}NO_8P$	744.556 7	744.554 3	3.28	1.1845	↓ *	EsA 0.25 mmol/L
5	莽草酸	10.41	$C_7H_{10}O_5$	155.034 7	155.034 4	2.07	6.8395	↑ *	EsA 0.25、0.75 mmol/L

↑ 表示与对照组相比水平上升; ↓ 表示与对照组相比水平下降; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

↑ Indicates an increase in level compared to the control group; ↓ indicates a decrease in level compared to the control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

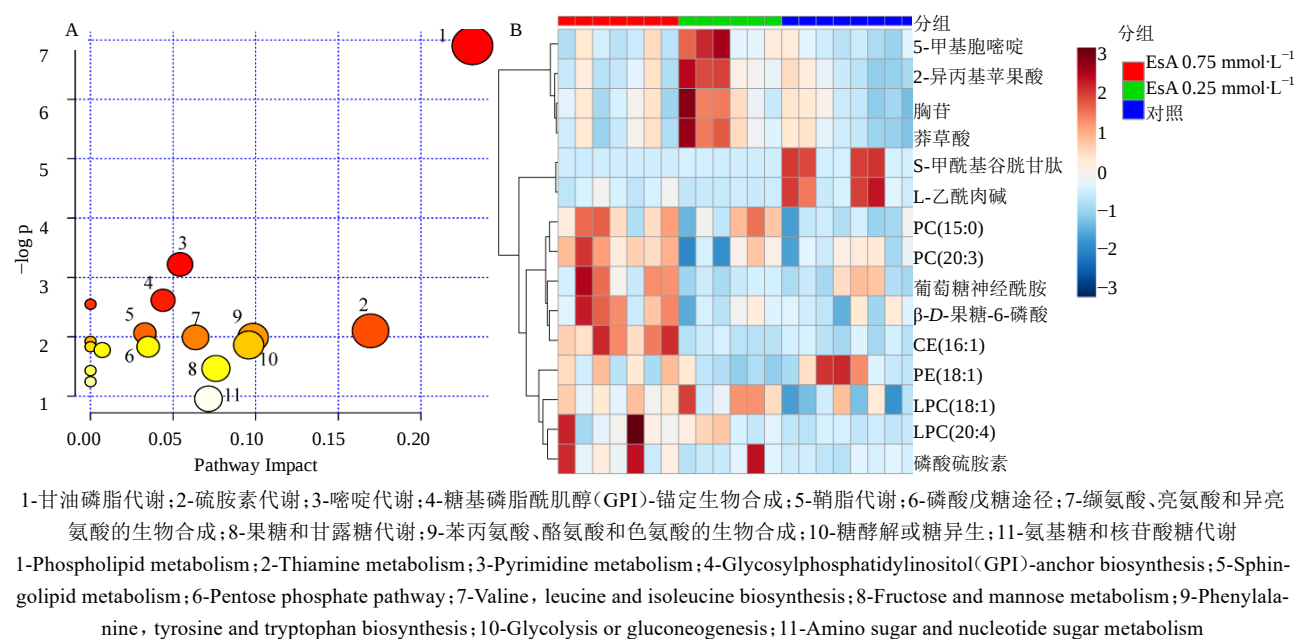


图3 EsA 毒性生物标志物进行 MetPA 分析得到的代谢通路图 (A) 和给药组和对照组差异代谢物热图 (B)

Fig. 3 Schematic diagram of metabolic pathways obtained by MetPA analysis of EsA toxic biomarkers (A) and differential metabolite heat map between drug-administered group and control group (B)

组和对照组呈现显著的分離,说明这些差异代谢物即可能为潜在的生物标志物。

3.5 通路富集分析

为了进一步揭示 EsA 诱导的 HKC 细胞毒性的差异代谢物之间的关系,将鉴定得到的差异代谢物导入 MetPA 做通路富集分析(图 3A、表 5)。根据结果分析可知,这些差异代谢物主要与甘油磷脂代谢、氨基酸代谢、嘧啶代谢、鞘脂代谢和能量代谢途径相关。

4 讨论

溶血磷脂酰胆碱(LPCs)是磷脂中的一类物质,由分泌型磷脂酶 A2 水解磷脂失去一分子的脂肪酸产生,磷脂酰胆碱(PC)类物质为细胞膜的主要成分,PCs 可以水解形成 LPCs,当细胞膜状态异常时,PC 类物质的含量发生变化进而影响 LPC 类物质,会

造成其含量上升^[15-17]。因此,当 LPC 类物质产生变化时,会影响细胞膜的性质和功能,同时它也可以造成血管舒张和诱导细胞凋亡^[18]。有研究发现 LPC 类物质也会影响血管的内皮功能^[19]。同时,张旭等^[20-24]发现,血浆中 LPC 类物质的水平变化可能与药物肾毒性相关,而氧化应激作用是药物引起肾脏损伤的机制之一,当给予大鼠肾毒性药物时,肾脏受到损伤,激活体内的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS),导致体内氧化应激水平发生变化,机体氧化和抗氧化应激系统失衡,导致肾脏功能异常。而 PCs 类物质可以清除体内过量 ROS 和 RNS,因此当肾脏出现损伤时,机体可能需要消耗大量的 LPCs 类物质来消耗过氧化物以致达到正常的氧化应激水平,从而使甘油磷脂代谢受到影

表5 基于MetPA平台的代谢通路分析结果
Table 5 Results from pathway analysis with MetPA

序号	通路名称	P值	-log P	影响因子
1	甘油磷脂代谢	0.001	6.902	0.231
2	缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	0.137	1.990	0.064
3	苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸的生物合成	0.137	1.990	0.098
4	嘧啶代谢	0.040	3.220	0.054
5	鞘脂代谢	0.127	2.062	0.033
6	硫胺素代谢	0.122	2.100	0.170
7	磷酸戊糖代谢	0.160	1.832	0.035
8	果糖和甘露糖代谢	0.231	1.466	0.076
9	糖酵解或糖异生	0.155	1.861	0.096
10	氨基糖和核苷酸糖代谢	0.385	0.956	0.071
11	糖基磷脂酰肌醇-锚定生物合成	0.073	2.615	0.044

响。本研究发现,与对照组比较,LPC(20:4)、LPC(18:1)等多种LPC及PC类物质水平上调,由此表明,这些物质的变化与EsA诱导的肾毒性存在着一定的关联。

氨基酸作为蛋白质的基本组成单位,其体内的代谢形式是十分复杂的,氨基酸的生物合成途径是体内基本代谢途径之一,因此,维持氨基酸生物合成的平衡对维持生物体良好的生长状态有着至关重要的作用。肾脏是氨基酸代谢的重要组织器官之一,因此,氨基酸代谢对肾病的发生和发展都有着重要的影响,明确氨基酸代谢的异常变化,有助于肾脏疾病的诊断和治疗^[25]。研究表明^[26-27],肾病患者血液中氨基酸代谢水平与正常人的差异有统计学意义。本实验中,代谢物苹果酸作为三羧酸循环的中间体,为机体提供能量。由于药物的毒性作用往往伴随能量代谢的异常,因此,氨基酸代谢紊乱表明,EsA可能干扰了正常的能量摄入与能量消耗。所以,EsA诱导的肾毒性可能干扰了三羧酸循环,进而干扰了能量代谢。

核苷酸是一类由嘌呤碱或嘧啶碱基、核糖或脱氧核糖以及磷酸三种物质组成的化合物^[28]。核苷酸类化合物具有非常重要的生物学功能,它们参与了机体内大多数的生化反应过程。其中,参与了嘧啶代谢的胞嘧啶和胸苷,在给予EsA刺激后,水平均显著上调,说明了二者参与了诱导肾功能代谢紊乱的变化过程。

鞘脂代谢是脂质代谢的重要组成部分,鞘脂是一类具有高生物活性的化合物,其主要代谢产物有神经鞘氨醇、神经酰胺和1-磷酸神经鞘氨醇等,参与了生物体内众多信号转导过程^[29-30]。维持这些代

谢物的平衡对于维持细胞的正常功能具有重要作用。神经酰胺在酶的作用下生成神经鞘氨醇和鞘磷脂^[31]。神经酰胺作为生成神经鞘氨醇和鞘磷脂的前体物质,在鞘脂代谢中有着尤为重要的作用。在本实验中,神经酰胺含量的变化打破了鞘脂代谢的平衡,它很有可能成为肾细胞毒性生物标志物。

肉碱类物质在能量代谢过程中占有重要的地位^[32],经代谢组学技术,检测到L-乙酰肉碱水平显著下调($P < 0.01$),酰基肉碱作为细胞的供能物质,在细胞代谢过程中发挥重要作用,其可将长链脂肪酸从胞质转运至线粒体,从而进行 β 氧化和三羧酸循环。肾脏功能异常会导致能量代谢的异常变化,破坏了细胞内的线粒体功能,提高了脂肪酸的 β 氧化,导致肉碱类物质消耗增加,因此L-乙酰肉碱水平降低。

本文发现EsA诱导的HKC细胞存活率降低以及细胞LDH含量上升,证实了EsA可诱导肾细胞毒性;利用UPLC-Q/TOF-MS技术,筛选出EsA诱导肾细胞毒性相关的15个生物标志物;对其代谢通路分析发现,氧化应激反应,氨基酸代谢,能量代谢以及脂质代谢通路可能是与EsA诱导的肾毒性关联更为密切的通路,为研究药物肾毒性提供了一定的思路和方法。

参考文献

- [1] Naughton C A. Drug-induced nephrotoxicity [J]. Am Fam Physician, 2008, 78(6): 743-750.
- [2] 冯雪,方赛男,高雨鑫,等. 中药肾毒性国内外研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 417-424.
- [3] 王鹏程,王秋红,赵珊,等. 商陆化学成分及药理作用 and 临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2722-2731.

- [4] 王立冬. 商陆皂苷甲防治对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤的作用及机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [5] 李一飞, 姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 248-251.
- [6] 徐婷婷, 金若敏, 姚广涛. 商陆致大鼠肾损伤的代谢组学 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 493-494.
- [7] 周倩, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲致肝毒性的研究 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 14-18.
- [8] Nicholson J K, Lindon J C, 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.
- [9] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.
- [10] 姚卫峰, 周莉娜, 张丽, 等. 细胞代谢组学及其应用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(3): 334-340.
- [11] West P R, Weir A M, Smith A M, et al. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 247(1): 18-27.
- [12] Bai J, Wang M X, Chowbay B, et al. Metabolic profiling of HepG2 cells incubated with S(-) and R(+) enantiomers of anti-coagulating drug warfarin [J]. *Metabolomics*, 2011, 7(3): 353-362.
- [13] 何小燕, 陈建丽, 向欢. 谷氨酸和皮质酮诱导的PC12抑郁症细胞模型差异性的¹H NMR代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 245-252.
- [14] Legido-Quigley C, Stella C, Perez-Jimenez F, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry methods for urinary biomarker detection in metabonomic studies with application to nutritional studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(7): 737-743.
- [15] Cao H C, Ma J, Yang J F. A metabonomics study of Chinese miniature pigs with acute liver failure treated with transplantation of placental mesenchymal stem cells [J]. *Metabolomics*, 2014, 10: 651-662.
- [16] Rousset X, Vaisman B, Amar M. Lecithin: cholesterol acyltransferase-from biochemistry to role in cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16(2): 163-171.
- [17] Burke J E, Dennis E A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling [J]. *J Lipid Res*, 2008, 50(Supplement): S237-S242.
- [18] Chun J, Goetzl E J, Hla T, et al. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, 4(2): 265-269.
- [19] Vuong T D, De K S, De R R, et al. Albumin restores lysophosphatidylcholine-induced inhibition of vasodilation in rat aorta [J]. *Kid Internat*, 2001, 60(3): 1088.
- [20] Sun J, Slavov S, Schnackenberg L K, et al. Identification of a metabolic biomarker panel in rats for prediction of acute and idiosyncratic hepatotoxicity [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2014, 10(17): 78-89.
- [21] Wagner M, Maggiori L, Ronot M, et al. Diffusion-weighted and T2-weighted MR imaging for colorectal liver metastases detection in a rat model at 7 T: a comparative study using histological examination as reference [J]. *Eur Radiol*, 2013, 23(8): 2156-2164.
- [22] Di Ieva A, Bruner E, Widhalm G, et al. Computer-assisted and fractal-based morphometric assessment of microvasculature in histological specimens of gliomas [J]. *Sci Rep*, 2012, 2(1): 429.
- [23] Steinbrecher U P, Pritchard P H. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase [J]. *J Lipid Res*, 1989, 30(3): 305-315.
- [24] Zhang X, Li Y, Zhou H, et al. Plasma metabolic profiling analysis of nephrotoxicity induced by acyclovir using metabonomics coupled with multivariate data analysis [J]. *J Pharm and Biomed Anal*, 2014, 97: 151-156.
- [25] 苏哲苓, 王怡. 肾脏病代谢组学中西医结合研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 6: 559-560.
- [26] 王旭方, 李梦婕, 葛永纯, 等. 糖尿病肾病患者血清及尿液代谢组学特点及临床意义 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2012, (3): 201-209.
- [27] 吴华, 徐中武, 唐志毅. 肾病综合征患者氨基酸代谢临床观察 [J]. 临床荟萃, 2003, 18(10): 563-564.
- [28] Stepiński J, Bizon D, Angielski S. The significance of the purine nucleotide cycle in metabolism of renal medulla [J]. *Contrib Nephrol*, 1991, 92(C6): 64.
- [29] Egom E E, Mamas M A, Clark A L. The potential role of sphingolipid-mediated cell signaling in the interaction between hyperglycemia, acute myocardial infarction and heart failure [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(8): 791-800.
- [30] Pedrosa L R, van Hell A, Süss R, et al. Improving intracellular doxorubicin delivery through nanoliposomes equipped with selective tumor cell membrane permeabilizing short-chain sphingolipids [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(7): 1883-1895.
- [31] 易丽昕. 中药香加皮心脏毒性成分药代动力学和代谢组学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [32] 陶秀梅. "肾虚"模型及证候的代谢组学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009.