

• 药理与临床 •

基于代谢组学的阿霉素肾病大鼠模型损伤程度评价

张王宁, 李爱平, 刘少博, 李 科, 秦雪梅*

地产中药药效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西省科技创新重点团队, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 以代谢组学技术对阿霉素肾病大鼠模型损伤程度进行量化分析。**方法** 采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术, 结合数理统计方法对不同给药剂量、给药次数的阿霉素肾病大鼠血清样本进行分析, 鉴定反映肾病进程的进展性标志物, 并依据相关标志物的变化率对肾脏损伤程度进行评价。**结果** 最终得到 9 个潜在的病理标志物, 分别为含氧异己酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙酮酸、3-羟基丁酸、柠檬酸、肌酐和肉毒碱; 其中含氧异己酸和肉毒碱存在一定的剂量依赖性, 即阿霉素造模剂量越大, 这些内源性代谢物的变异越大, 表明肾脏损伤越严重, 可作为反映肾病进程的进展性标志物。**结论** 这一研究为肾病提供了诊断标志物, 为研究其他进展性疾病的发病进程及早期诊断标志物的发现提供研究方法和思路。

关键词: 代谢组学技术; 阿霉素; 肾病模型; 损伤程度; 病理标志物; 含氧异己酸; 异亮氨酸; 亮氨酸; 缬氨酸; 丙酮酸; 3-羟基丁酸; 柠檬酸; 肌酐; 肉毒碱

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0360-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.015

Evaluation of injury degree of rat nephropathy model induced by doxorubicin based on metabolomics

ZHANG Wang-ning, LI Ai-ping, LIU Shao-bo, LI Ke, QIN Xue-mei

Science and Technology Innovation Team of Shanxi Province, Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To carry out the quantitative analysis of the injury degree of model rat of doxorubicin-induced nephropathy based on metabolomics. **Methods** $^1\text{H-NMR}$ based metabolomics approach combined with multivariate statistical analysis were used to analyze rat serum samples from different doses and different times of doxorubicin administration and identify the progressive markers reflecting the progress degree of nephropathy. Moreover, the evaluation of injury degree of rat nephropathy model induced by doxorubicin was conducted according to the change degree of related markers. **Results** Nine potential biomarkers for pathological conditions were obtained such as 2-oxoisocaproate, isoleucine, leucine, valine, pyruvate, 3-hydroxybutyric acid, citric acid, creatinine, and carnitine, among which 2-oxoisocaproate and carnitine were in a dose-dependent manner, that is, the greater the dose of doxorubicin, the greater the variation of the endogenous metabolites, the more severe kidney injury, indicating that 2-oxoisocaproate and carnitine can be used as a progressive markers reflecting the process of kidney disease. **Conclusion** This study provides the diagnostic marker of nephropathy, and provides research methods and ideas for the study of other progressive diseases and the discovery of early diagnostic markers.

Key words: metabolomics; doxorubicin; rat nephropathy model; degree of injury; pathological markers; 2-oxoisocaproate; isoleucine; leucine; valine; pyruvate; 3-hydroxybutyrate; citrate; creatinine; carnitine

肾病综合征是由于各种病因导致的肾小球滤过膜通透性发生改变的一个症候群, 大量尿蛋白是其主要特点和诱因, 其引发的高血压、高血脂会促进

肾小球硬化, 产生严重后果^[1]。临床诊断主要依据尿蛋白定量以及血浆白蛋白水平; 具体病理类型需要依据肾穿刺组织病理进行判断^[2]。诊断依据前者

收稿日期: 2017-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570346); 黄芪生长年限与化学成分积累规律研究 (201605D211030); 山西省中药产业重点科技攻关项目: 道地药材种质资源与规范化生产技术研究 (201603D311101); 山西省药材行业标准-恒山黄芪药材与精品饮片商品等级标准研究 (2014ZD0401)

作者简介: 张王宁 (1993—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药体内药物分析。Tel: 18435148209 E-mail: 18435148209@163.com

***通信作者** 秦雪梅, 女, 博士, 教授, 主要从事中药质量控制及新药研发方面的工作。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

专属性差, 后者病人依从性差, 对该病的治疗和预后都非常不利, 因而建立非入侵快速诊断方法非常重要, 尤其寻找能够作为早期诊断肾病综合征的潜在病理标志物, 对减缓肾功能的恶化, 预防并发症尤为关键。

阿霉素肾病动物模型是公认的能很好模拟肾病综合征的动物模型, 其造模机制可能是由于阿霉素产生自由基和过氧化物造成足细胞基底膜结构和功能破坏, 其表现形式类似于微小病变性肾病综合征^[3]。文献中报道的阿霉素肾病模型, 肾脏损伤程度受给药剂量、给药方式、给药次数等因素影响^[4]。本课题组前期通过反复实验, 以大鼠一般状态、脏器指数、尿蛋白定量水平、组织病理学以及血清生化指标评价上述因素对阿霉素肾病大鼠模型的影响, 探究肾脏损伤的程度, 最终确定了 (4+1) mg/kg 阿霉素肾病大鼠模型是适合于防己黄芪汤药效评价的最优模型^[5]。但上述这些因素对大鼠内源性代谢物的干预作用差异仍然未见报道。探索研究这些因素对机体内源性代谢物的影响, 有助于进一步从分子水平了解肾病的发病机制和进程, 有望发现对疾病早期诊断或与肾病进程相关的潜在生物标志物。

代谢组学以其不断增加的覆盖范围及其内在的高通量能力在许多领域中得到应用, 如疾病诊断和治疗^[6]、药物毒性研究^[7-8]、生物标志物发现^[9-10]以及疾病机制探索^[11]等。因而, 本研究拟采用¹H-NMR 代谢组学技术结合数理统计方法对不同给药剂量、给药次数的阿霉素肾病大鼠血清样本进行分析, 以期寻找与肾病综合征发病进程相关的潜在病理标志物, 为该病诊断、治疗及预后提供研究基础, 为基于肾病综合征的中药药效评价提供模型参考, 为研究其他进展性疾病的发病进程及早期诊断标志物的发现提供研究方法和思路。

1 材料

1.1 试剂与仪器

甲醛、二甲苯均属于分析级 (天津市大茂化学试剂厂); 三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., 美国); NMR 试剂重水 (Norell, Landisville, 美国); 双辛丁酸 (BCA) 蛋白测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 阿霉素 (深圳万乐药业股份有限公司, 批号 1412E1, 规格 10 mg/支)。

不同规格 Gilson 移液枪 (北京伯辉生物科技有限公司); Sartorius BSA124S 分析天平 (德国 Sartorius 公司); KYJ-3 氮吹仪专用空气源 (北京斯珀特科技有限公司); 超声波细胞粉碎机 (宁波新

芝生物科技股份有限公司); Tecan Infinite® 200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士公司); SC-3610 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); Heal Forece Neofuge 13R 高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司); Bruker 600-MHz AVANCE III NMR 检测仪 (德国布鲁克公司)。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2013-0014; 动物饲养室保持温度 (23.0±1.5) °C, 相对湿度 (45±15) %。

2 方法

2.1 分组与造模

大鼠适应期 (1 周或 2 周, 一般购回大鼠 4~8 周龄, 体质量 180~220 g, 适应 1 周后, 体质量约 250 g, 适应 2 周后, 体质量约 300 g) 过后, 模型组大鼠单次或分 2 次尾 iv 阿霉素造模, 其中单次注射只需于实验第 1 天给予相应剂量的阿霉素, 而分 2 次注射分别于第 1 天和第 8 天给予, 中间间隔 1 周, 对照组大鼠给予等量生理盐水。其中以 (5+2) mg/kg 的大鼠模型为例, 模型组大鼠于第 1 天尾 iv 5 mg/kg 的阿霉素, 随后隔 1 周, 于第 8 天尾 iv 2 mg/kg 的阿霉素, 复制阿霉素肾病模型。动物实验分 3 批进行, 具体分组见表 1。

表 1 分组及具体给药处理

Table 1 Grouping and administration treatment of drugs

批次	组别	造模处理	动物体质量
1	C1	不造模, iv 生理盐水	约 250 g
	M1	分 2 次 iv 阿霉素, (5+2) mg·kg ⁻¹	约 250 g
2	C2	不造模, iv 生理盐水	约 250 g
	M2	1 次 iv 阿霉素, 6 mg·kg ⁻¹	约 250 g
	M3	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	约 250 g
3	C3	不造模, iv 生理盐水	约 300 g
	M4	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	约 300 g

2.2 样本收集

各组尾 iv 后第 0、14、28、42、49 天分别收取 24 h 尿液, 用 BCA 法测定尿蛋白含量, 实验周期持续 7 周。动物禁食 12 h 后, 大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉, 股动脉取血, 将血样收集到 EP 管中, 静置约 1 h, 离心以获得血清。将所有大鼠的左肾组织浸泡在 10%中性福尔马林缓冲液中进行固定, 将剩余的右肾组织, 生理盐水冲洗, 滤纸吸水, 并于液氮中快速冷冻后储存在-80 °C 备用。

2.3 尿蛋白定量测定

将收集到的尿液依据 BCA 蛋白测定试剂盒说明书,采用酶标仪 Infinite 200 Pro 于 562 nm 测定大鼠 24 h 尿液吸光度 (A) 值,依据标准曲线计算尿蛋白质量浓度。通过将尿蛋白质量浓度 (mg/mL) 乘以 24 h 尿体积 (mL) 来计算 24 h 尿蛋白排泄量。

2.4 肾组织病理分析

取经 10% 中性福尔马林固定的肾组织,经自来水冲洗固定液,酒精梯度脱水后,对组织进行二甲苯透明,浸蜡后包埋;包埋后的组织 3~5 μm 切片,经 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片后待染色。进行 HE 染色;透明及封片后进行光镜检查。

2.5 NMR 代谢组学数据采集

2.5.1 血清样品处理 血清样本在冰水中解冻,精密吸取血清 300 μL 置于 EP 管中,再加入 600 μL 的分析纯甲醇,涡旋混匀,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 min 沉淀蛋白,取出后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 15 min,取上清 600 μL 于 EP 管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下氮气流中吹干,在测试前用 600 μL 磷酸盐缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0; 含 0.01% TSP, 10% D_2O) 复溶,取上清液 550 μL 血样转移至核磁管中,待测。

2.5.2 NMR 测试条件 Bruker 600-MHz AVANCE III NMR 检测仪采集数据,采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列,具体参数:扫描次数为 64,谱宽 12 345.7 Hz,脉冲时间 14 μs ,采样时间 2.654 s,延迟时间 1.0 s,采样数据点 65 536,采样间隔 40.5 μs ,内标为 TSP。

2.5.3 核磁图谱处理 核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 软件处理。所有图谱进行手动相位、基线调整。核磁图谱以 TSP 的化学位移 δ 0.00 定标,经手动相位、基线校准后,以 δ 0.01 对化学位移 δ 0.83~8.48 进行积分。其中残余水峰 (δ 4.68~5.20) 不积分,以消除残余水峰的影响。积分数据采用面积归一化处理,产生数据矩阵,导入 Excel 用于多元统计分析。

2.6 多元统计分析

数据采用 SPSS 16.0 软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 t 检验对各指标进行统计和比较。采用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Umea, 瑞典) 软件进行主成分分析 (PCA),再用偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分

析 (OPLS-DA),以及 S-plot 分析中相关系数 ($r > 0.7$)、VIP > 1 ,找出差异代谢物。根据分析结果,对差异代谢物相对峰面积进行 t 检验和接收者操作特征曲线 (ROC 曲线) 分析,以期筛选对分组贡献大的差异代谢物。

3 结果

3.1 阿霉素肾病模型复制评价

3.1.1 尿蛋白定量 蛋白尿是许多肾小球疾病重要的病变标志,也是足细胞损伤的风险因素,反映肾小球滤过屏障结构和功能的破坏^[12-13]。由表 2 可知,与 C 组比较,M 组大鼠造模后尿蛋白排泄量随时间呈现稳定上升趋势,且于第 14 天具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明造模成功。由于 M1 组的大鼠在后期死亡情况严重,故未对 M1 组大鼠尿液进行蛋白定量测定。

表 2 各组大鼠造模第 14 天尿蛋白定量分析

Table 2 Quantitative analysis of proteinuria of rats in each group 14th d after modeling

组别	尿蛋白排泄量/mg
C2	72.03 $\pm$ 12.30
M2	179.73 $\pm$ 65.74*
M3	109.42 $\pm$ 30.18*
C3	57.10 $\pm$ 14.79
M4	71.19 $\pm$ 26.28*

与 C2 或 C3 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs C2 or C3 group

3.1.2 大鼠肾脏病理组织分析 由图 1 可知,与 C 组比较,模型组 (M1、M2、M3、M4) 均表现为不同程度的肾小管上皮细胞中至重度水样变性,小管嗜碱性变及蛋白管型多见,成纤维细胞中至重度增生,间质炎细胞中至重度浸润,部分小管上皮细胞萎缩,管腔变大,表明模型复制成功,且 M1 最严重,M4 较轻,M2 和 M3 介于二者之间。

3.2 血清指纹分析

通过化学位移、峰形及偶合常数等 ^1H -NMR 数据分析,以及参照数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://bmrb.wisc.edu/>) 和文献数据^[14-16]对照,从大鼠血清 ^1H -NMR 图谱中辨认出 34 种代谢物,包括氨基酸、糖类、有机酸等。具体化学信息指认结果见表 3。

3.3 阿霉素肾病潜在病理标志物鉴定

首先以所有的 C 组和 M 组构建无监督模式识别的 PCA,可以反映数据的原始状态,较直观显示不同样品之间的整体差异,以前 2 个主成分为坐标

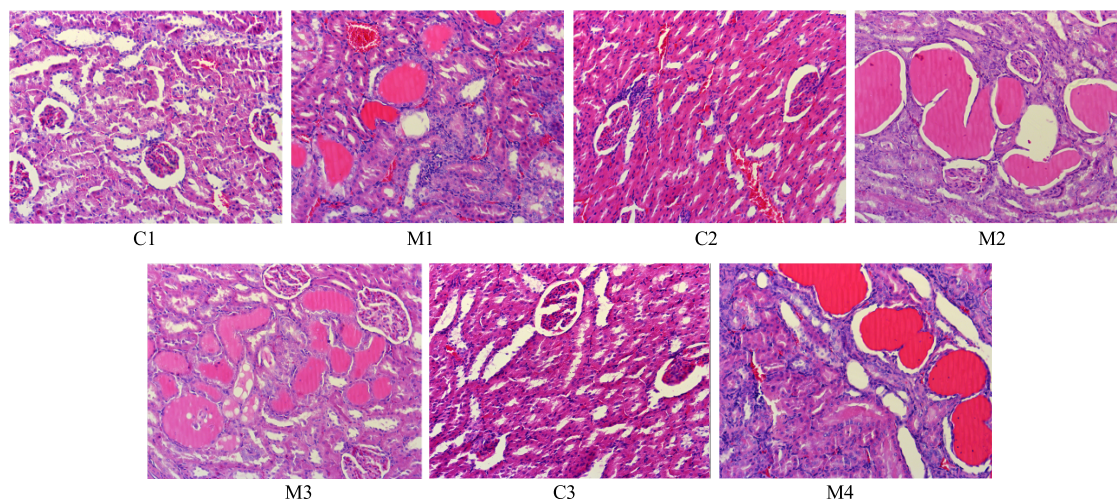


图 1 肾组织病理 HE 染色结果 (×200)

Fig. 1 Representative photomicrographs of kidney tissue of rats in each group by HE staining (× 200)

表 3 大鼠血清中 34 种代谢物归属

Table 3 Assignments of 34 metabolites from rat serum

编号	代谢物	δ_H (特征峰)	编号	代谢物	δ_H (特征峰)
1	含氧异己酸	0.94 (d, $J = 6.6$ Hz), 2.62 (d, $J = 7.2$ Hz)	18	2-甲基甘氨酸	2.93 (s)
2	异亮氨酸	0.95 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.2$ Hz)	19	肌酸	3.04 (s)
3	缬氨酸	0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.05 (d, $J = 7.2$ Hz)	20	肌酐	3.05 (s), 4.07 (s)
4	亮氨酸	0.97 (t, $J = 6.6$ Hz)	21	胆碱	3.21 (s)
5	2-氧代异戊酸	1.13 (d, $J = 7.8$ Hz)	22	甜菜碱	3.27 (s), 3.9 (s)
6	3-羟基丁酸	1.21 (d, $J = 6.0$ Hz), 2.41 (m), 2.31 (dd, $J = 13.8, 6.6$ Hz)	23	甘氨酸	3.57 (s)
7	乳酸	1.33 (d, $J = 6.6$ Hz), 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz)	24	苏氨酸	4.26 (m)
8	丙氨酸	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)	25	β -葡萄糖	4.66 (d, $J = 7.8$ Hz)
9	乙酸酯	1.93 (s)	26	α -葡萄糖	3.90 (dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz), 5.24 (d, $J = 7.8$ Hz)
10	赖氨酸	1.45 (m), 1.73 (m), 1.90 (m)	27	甘露糖	5.19 (d, $J = 2.0$ Hz)
11	谷氨酸	2.05 (m), 2.11 (m), 2.35 (m)	28	尿囊素	5.39 (s)
12	谷氨酰胺	2.14 (m), 2.45 (m)	29	酪氨酸	6.91 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz)
13	甲硫氨酸	2.14 (s), 2.65 (t, $J = 7.2$ Hz)	30	色氨酸	7.55 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.74 (d, $J = 7.8$ Hz)
14	丙酮酸	2.38 (s)	31	苯丙氨酸	7.34 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)
15	琥珀酸	2.41 (s)	32	苯甲酸	7.84 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.44 (m)
16	2-酮戊二酸	2.45 (t, $J = 7.8$ Hz), 3.03 (t, $J = 7.8$ Hz)	33	甲酸酯	8.46 (s)
17	柠檬酸	2.54 (d, $J = 15.0$ Hz), 2.67 (d, $J = 15.0$ Hz)	34	肉毒碱	3.24 (s)

轴构建得分散点图(图 2-A)可以看出, 3 批实验大鼠血清样本因批次差异而聚成 3 个组, 难以反映生物因素的影响, 如阿霉素造模。因此, 本研究参照文献方法^[17-18], 采用经验贝叶斯方法调整批次差异的影响作用, 结果如图 2-B 所示, 各批实验大鼠分散均匀, 具有可比性, 突显生物因素影响而减小批次间差异的非生物因素影响, 为后续 3 批实验以代谢物变异程度反映肾脏损伤程度的比较研究提

供保障。

以所有的 C 组和 M 组构建 PLS-DA 模型, 如图 3-A 所示, 排列实验中所有左边排列值均低于右边原始值, 且 $R^2_X = 0.561$, $R^2_Y = 0.601$, $Q^2 = 0.53$, 表明模型成功, 可用于后续差异代谢物的鉴定。OPLS-DA 散点图(图 3-B)显示, C 组与各 M 组大鼠明显分开, 验证模型 CV-ANOVA 结果 $P = 8.207 \times 10^{-9} < 0.05$, 进一步表明模型稳定可靠; 相应的

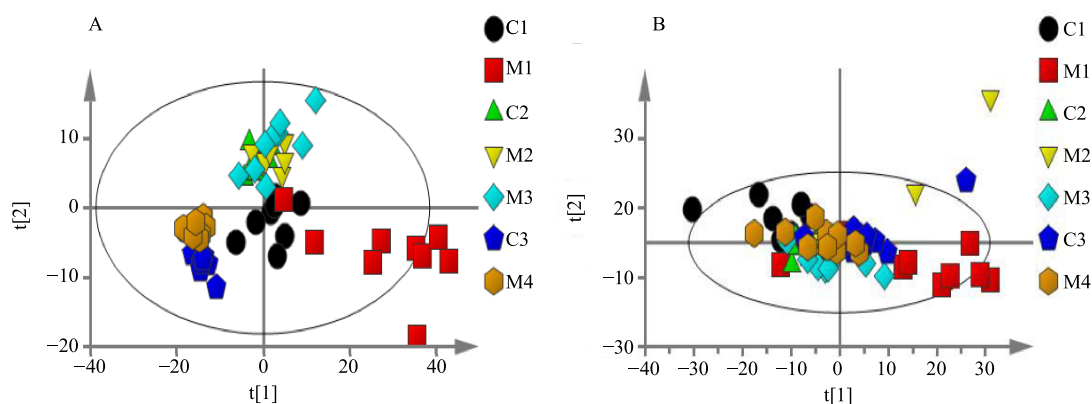


图 2 3 批实验大鼠血清代谢物 PCA 散点图 (A) 和调整批次差异后 3 批实验大鼠血清代谢物 PCA 散点图 (B)

Fig. 2 PCA score plot of serum metabolites from three batches of rats (A) and three batches of rats after batch adjustment (B)

S-plot (图 3-C) 结合 VIP (>1) 寻找对二者分组贡献较大的差异代谢物, 进一步通过 t -检验 ($P < 0.05$) 和 ROC 曲线 [待评估代谢物的曲线下面积 ($AUC \geq 0.7$), 表明该代谢物具有较强的诊断能力] (图 3-D) 进行筛选, 最终通过取交集得到 9 个潜在的病理标志物, 分别为含氧异己酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙酮酸、3-羟基丁酸、柠檬酸、肌

酞和肉毒碱, 具体评价参数见表 4。

3.4 阿霉素肾病损伤程度评价

直观分析 PLS-DA 散点图 (图 4), M1 与 M4 组分布沿 $t[1]$ 轴, 相差距离较远, 而 M2 和 M3 处于二者之间, 说明不同方式、不同剂量的阿霉素对大鼠血清代谢物轮廓影响不同, 反映肾脏损伤有差异。各 M 组组内分布较散, 说明不同大鼠存在个

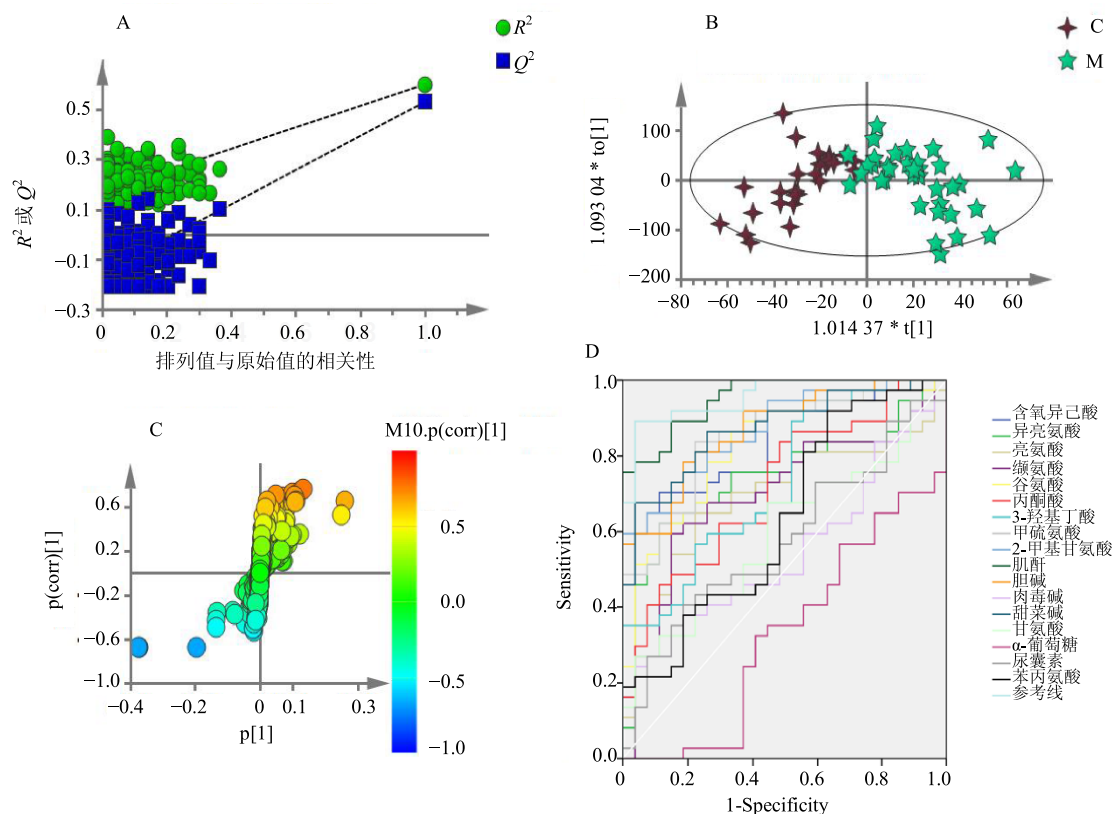


图 3 对照组与阿霉素肾病大鼠血清 PLS-DA 排列图 (A)、OPLS-DA 散点图 (B)、S-plot (C) 和 ROC 曲线图 (D)

Fig. 3 Permutation test from PLS-DA analysis (A), OPLS-DA score plot (B), S-plot (C), and ROC curve analysis (D) of rat serum from control and doxorubicin-induced nephropathy groups

表 4 3 种方法鉴定对对照组与阿霉素肾病大鼠模型组分类贡献大的差异代谢物

Table 4 Three different methods to identify significant metabolites contributed to classification between control and model group

编号	差异代谢物	δ_H	VIP	t 检验	ROC AUC
1	含氧异己酸	0.95	2.17	1.59×10^{-7}	0.82
2	异亮氨酸	0.96	1.61	1.27×10^{-4}	0.74
3	亮氨酸	0.97	1.35	2.13×10^{-3}	0.70
4	缬氨酸	0.99	1.08	3.32×10^{-3}	0.70
5	丙酮酸	2.38	1.69	9.67×10^{-3}	0.72
6	3-羟基丁酸	2.41	1.22	1.74×10^{-3}	0.73
7	柠檬酸	2.68	1.07	2.57×10^{-3}	0.87
8	肌酐	3.05	3.28	4.45×10^{-8}	0.87
9	肉毒碱	3.24	6.65	1.10×10^{-6}	0.87

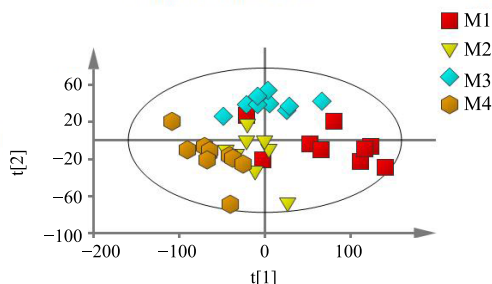


图 4 不同模型组大鼠的血清 PLS-DA 散点图

Fig. 4 PLS-DA score plot of rat serum from different model groups induced by doxorubicin

表 5 差异代谢物在不同模型组中的变化率及趋势

Table 5 Change rate and trend of differential metabolites among different groups

差异代谢物	δ_H	α [M1]	α [M2]	α [M3]	α [M4]	趋势
含氧异己酸	0.95	0.996	0.853	0.356	0.135	↓
异亮氨酸	0.96	0.655	0.593	0.333	-0.089	↓
亮氨酸	0.97	0.504	0.378	0.354	-0.169	↓
缬氨酸	0.99	0.545	0.379	0.358	-0.145	↓
丙酮酸	2.38	1.318	-0.197	-0.106	0.566	—
3-羟基丁酸	2.41	0.842	-0.281	0.270	0.533	—
柠檬酸	2.68	1.551	0.318	0.122	0.779	—
肌酐	3.05	0.575	0.807	0.875	0.031	—
肉毒碱	3.24	1.390	0.854	0.735	0.256	↓
平均变化率	—	0.931	0.518	0.390	0.300	

↓ -下降趋势 —波动趋势

↓ -decrease trend —volatility trend

4 讨论

4.1 氨基酸代谢

肾脏在氨基酸体内平衡中起重要作用，是一种

动态器官，富含氨基酸分解代谢和/或氧化所需的酶机制，能够提供能量维持活性离子转运^[19]。因此，本研究中模型组血清氨基酸水平的改变表明肾脏蛋

$$\bar{\alpha} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-9} |\alpha| = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-9} \left| \frac{M_i - K_i}{K_i} \right|$$

M_i 、 K_i 分别表示对照组和模型组中各代谢物的相对含量， α 表示各代谢物的变异程度， $\bar{\alpha}$ 表示各代谢物的平均变化率

由表 5 可知，M1~M4 组中 $\bar{\alpha}$ 分别为 0.931、0.518、0.390 和 0.300，初步表明就上述鉴定的病理标志物而言，(5+2) mg/kg 阿霉素给予 SD 大鼠，各代谢物变异程度较大，即 $\bar{\alpha}$ 较高，对肾脏损害最严重，(4+1) mg/kg 损伤程度较轻，而 M2 和 M3 损伤程度介于二者之间，且单次大剂量 (6 mg/kg) 给予对肾脏的损害较相同剂量分 2 次 (4+2) mg/kg 造模损伤更大。进一步分析发现含氧异己酸、柠檬酸、肌酐和肉毒碱在各批实验 C 组与相应 M 组中变化趋势一致，即与 C 组相比，M 组中上述 4 种代谢物的含量均升高；其中含氧异己酸和肉毒碱存在一定的剂量依赖性，即剂量越大，代谢物的变化率越大，肾脏损伤程度越大，可作为反映肾病进程的进展性标志物；而异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙酮酸、3-羟基丁酸变化趋势存在差异。

体差异，对阿霉素响应不同。为进一步探究不同给药方式、不同给药剂量对阿霉素肾病大鼠损伤程度的大小，对上述找到的病理标志物进行半定量分析 (以该化合物的特征峰的相对峰面积作为该化合物定量的依据)，计算各代谢物的变化率，即肾脏平均损伤程度 ($\bar{\alpha}$ ，其中正值表示 M 组含量高于 C 组，负值表示 M 组含量低于 C 组)。

白质代谢异常, 能量代谢紊乱, 进而会影响离子迁移的变化, 反映肾功能受损。另外, 亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是重要的支链氨基酸, 也是生糖氨基酸^[20], 本研究中模型组这些代谢物的升高表明能量消耗模式向糖异生转变, M4 组中这些代谢物水平的降低进一步表明 (4+1) mg/kg 阿霉素对肾脏的损害较轻, 不足以严重影响其糖有氧代谢。另有文献报道缬氨酸和亮氨酸一起可以调节血清葡萄糖水平, 为机体活动提供能量, 还可以促进组织的损伤修复^[21]。本研究中 M1、M2、M3 和 M4 组血清中这些代谢物水平的剂量依赖性变异, 进一步反证了不同剂量阿霉素对肾脏的进展性损伤程度。

4.2 脂质代谢

3-羟基丁酸水平能够反映脂肪酸 β -氧化作用, 当葡萄糖受到限制时可用作替代能源^[22]。当游离脂肪酸的 β 氧化衍生的乙酰辅酶 A (CoA) 超过三羧酸 (TCA) 的能力时, 酮体的水平可能增加^[23]。本研究中各模型组血清中 3-羟基丁酸含量的升高, 表明 TCA 循环受阻, 能量供应模式由糖氧化向脂肪酸 β 氧化转变和生酮作用, 间接反映能量代谢受损。而 M2 组中 3-羟基丁酸含量的降低, 可能由于阿霉素首剂量过大不仅影响糖代谢, 而且严重影响脂质代谢。肉毒碱可促进脂肪酸在氧化过程中运动到线粒体基质中^[24], 肉毒碱也通过接受或给予乙酰基团的能力在稳定 CoA 和 CoA 水平方面发挥作用^[25]。本研究中模型组血清肉毒碱水平升高表明阿霉素造模促进脂肪酸的氧化, 验证上述能量供应由糖代谢向脂肪酸氧化转变。另外, 据文献报道, 肉毒碱对终末期肾脏疾病的大多数参数无影响, 但可能对 C 反应蛋白 (CRP) 有影响^[26]。CRP 主要作为炎症的标志物, 能够在急慢性炎症情况下, 响应升高的白细胞介素-6 (IL-6), 激活补体系统, 促进巨噬细胞吞噬, 清除坏死细胞和凋亡细胞, 发挥先天免疫力的作用^[27]。因而本研究中模型组中肉毒碱含量的升高暗示阿霉素诱导肾脏发生炎症反应进而导致肾脏损伤。

4.3 糖代谢

丙酮酸是人体众多代谢途径的枢纽中间产物, 是合成 CoA 的重要原料, 是线粒体供能的重要环节之一。丙酮酸经 TCA 循环可以实现糖、脂、氨基酸三大能量物质之间的互相转化^[23]。另外, 丙酮酸在机体内无氧条件下还原成乳酸, 也可参与供能, 在糖异生途径中可参与产生草酰乙酸, 也是糖酵解

的最终产物, 因而对体内能量代谢具有十分重要的作用^[28]。本研究中各模型组中丙酮酸变异趋势与水平的不同, 反映不同阿霉素造模剂量和次数对大鼠机体能量代谢影响不同, 具体代谢变化机制需进一步采用稳定同位素进行跟踪分析。

4.4 其他与能量代谢相关的代谢途径

柠檬酸是 TCA 循环的中间产物, 模型组中柠檬酸含量的升高, 表明 TCA 循环受阻, 底物消耗减少, 进而会影响能量供应^[29]。这一研究结果在 HgCl₂ 诱导的肾毒性^[30]以及朱砂诱导的肾损伤^[31]模型中得到验证, 推测柠檬酸通过对外源毒素改变肾小管酸碱平衡状态, 进而影响 TCA 循环关键代谢酶活性。

肌酐是评估肾功能重要的指标, 是肌酸和磷酸肌酸的非酶分解产物, 其中肌酸-磷酸肌酸系统对细胞能量运输至关重要^[32]。本研究中阿霉素诱导的肾病综合征大鼠血清中肌酐含量升高, 表明肾功能损伤, 这一结果与腺嘌呤诱导的慢性肾衰的动物模型一致, 反映了进行性肾功能障碍^[33]。M4 组中该代谢物变异程度较小, 表明肾脏损伤程度较轻或者说处于肾病发病早期。

综上所述, ¹H-NMR 代谢组学技术结合数理统计分析手段能够成功探究肾病发病机制, 通过多种方法相结合寻找到 9 个病理标志物, 涉及能量代谢、脂质代谢以及氨基酸代谢。并且通过计算血清内源性代谢物的变化率, 间接反映肾病的损伤程度, 初步确定了用于早期诊断和反映肾病综合征进程的潜在生物标志物: 含氧异己酸和肉毒碱。由于本实验大鼠模型复制分批进行, 虽然采取相关数学方法进行矫正, 但不排除方法选择的合理性缺陷, 因而后期一方面考虑重复上述模型的复制以验证病理标志物的准确性, 另一方面考虑通过研究尿液中内源性代谢物的动态变化, 找寻与肾病进程相关的标志物, 有望为临床研究提供诊断依据。

参考文献

- [1] 陆再英, 终南山. 内科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [2] 陈志强, 黄文政. 肾炎 3 号方治疗微小病变型肾病的实验研究 [J]. 天津中医, 2000, 17(6): 30-31.
- [3] 王彩云, 邓虹珠, 李 辉. 胡枝子总黄酮治疗大鼠微小病变型肾病综合征的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 614-617.
- [4] 张常明. 防己黄芪汤干预阿霉素肾病大鼠的药效学实

- 验研究 [D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2012.
- [5] 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 151-159.
- [6] 冯光明. 逍遥散治疗抑郁症的临床观察及 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [7] 彭双清, 廖 艳, 颜贤忠. 药物毒性作用机制的代谢组学研究 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 175-176.
- [8] 徐文峰, 裴月湖. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学牛黄解毒片中人工牛黄、石膏、冰片对雄黄配伍减毒作用的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 129-135.
- [9] Xia X T, Sun N, Liu C C, *et al.* Discovering potential biomarkers of depression and drug intervention of paroxetine based on $^1\text{H-NMR}$ metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(4): 595-599.
- [10] 王珂欣, 高 丽, 段丹丹, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学的黄芩素干预 D-半乳糖致衰老大鼠作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 511-518.
- [11] Zhang C G, Cheng Q, Tang Y B, *et al.* Progress in the study of urinary metabonomics in the diagnosis and mechanism of neurodegenerative diseases [J]. *Diagn Theory Pract*, 2016, 15(1): 77-79.
- [12] Salmon A H, Neal C R, Harper S J. New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: Five layers (at least) not three [J]. *Current Opin Nephrol Hypert*, 2009, 18(3): 197-205.
- [13] Reiser J, Von Gersdorff G, Simons M, *et al.* Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2002, 17(6): 951-953.
- [14] 郑 磊. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 技术的黄连上清丸解热作用代谢组学研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [15] 牛倩芸. 基于代谢组学技术的黄芪抗心衰作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [16] 刘妍如. 更年期综合征及贯叶连翘治疗机制的代谢组学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2014.
- [17] 雷文娟, 张 铿, 潘庆军, 等. 原发性肾病综合征患者急性肾损伤标志物的检测及其意义 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(6): 499-501.
- [18] Johnson W E, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods [J]. *Biostatistics*, 2007, 8(1): 118-127.
- [19] 王 超. 慢性肾脏病的尿液蛋白质组学及血清降浊胶囊的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [20] Yi L Z, Shi S T, Wang Y, *et al.* Serum metabolic profiling reveals altered metabolic pathways in patients with post-traumatic cognitive impairments [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep21320.
- [21] Wu Q F, Zou M, Yang M X, *et al.* Revealing potential biomarkers of functional dyspepsia by combining ^1H NMR metabonomics techniques and an integrative multi-objective optimization method [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep18852.
- [22] Pariyani R, Ismail I S, Azam A, *et al.* Urinary metabolic profiling of cisplatin nephrotoxicity and nephroprotective effects of orthosiphon stamineus leaves elucidated by ^1H NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 135(20): 20-30.
- [23] 王镜岩. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [24] Gobe G C, Coombes J S, Fassett R G, *et al.* Biomarkers of drug-induced acute kidney injury in the adult [J]. *Exp Opin Drug Metabol Toxicol*, 2015, 11(11): 1683-1694.
- [25] 郭永忠, 齐 海. 左卡尼汀对体外循环心脏手术患者心肌的保护作用 [J]. 新疆医学, 2011, 41(6): 15-18.
- [26] 白 云, 邱楚雄, 薛伟新, 等. 肾康注射液对糖尿病肾病患者疗效及 C 反应蛋白, 白介素-6 的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(15): 17-19.
- [27] 宋 红, 郑小伟, 王 颖, 等. 基于核磁共振技术的益肾喘宁汤对支气管哮喘肾气虚证模型大鼠血清代谢组学的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(11): 962-965.
- [28] 李晓芸, 卞 卡. 茜草对人神经胶质瘤 U87 细胞的生长及丙酮酸代谢的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 171-180.
- [29] Wang Y, Zhao M, Xin Y, *et al.* ^1H NMR and MS based metabolomics study of the therapeutic effect of *Cortex Fraxini* on hyperuricemic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185(5): 272-281.
- [30] Yuan J L, Liu C H, Jiang Z H, *et al.* Effects of oral administration of HgCl_2 on renal interstitial fibrosis in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2006, 14(2): 93-95.
- [31] 王大鹏. 朱砂致大鼠亚慢性肾毒性及其机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁医学院, 2014.
- [32] 张 弛, 彭佑铭. 慢性肾病患者肾功能评价指标与肾小球硬化关系研究 [J]. 长沙医学院学报, 2009, 9(19): 17-21.
- [33] Chen D Q, Chen H, Chen L, *et al.* The link between phenotype and fatty acid metabolism in advanced chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2017, 32(7): 1154-1166.