

肾毒性小分子代谢标志物在5种中药毒性评价的适用性研究

郭雪君¹, 谷彩云¹, 许妍妍¹, 李遇伯¹, 张艳军^{2*}

1. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

2. 天津市省部共建现代中药重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 考察前期发现的肾毒性小分子代谢标志物在中药毒性评价中的适用性。**方法** 以已知具有肾毒性的5种中药雷公藤、马钱子、广防己、大黄和苍耳子提取液 ig 给予大鼠建立肾脏损伤模型, 收集给药1和7 d后的血样, 应用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC/Q-TOF-MS)检测5种肾毒性生物标志物胸苷、溶血磷脂酰胆碱 LPC(16:1)、LPC(18:4)、LPC(20:5)和LPC(22:5)水平, 建立支持向量机(SVM)预测模型对其毒性进行判断; 全自动生化仪测定血清中Cr和BUN的水平; 各组大鼠于取血后处死, 迅速取肾脏进行HE染色, 光学显微镜下观察病理表现。**结果** 对照组没有表现出毒性。5种中药在给药1 d后, 生化检测没有发现肾脏损伤, 肾毒性支持向量机预测模型发现异常; 在给药7天后, SVM的预测结果与生化和病理检测结果一致, 均出现肾毒性。**结论** 代谢组学技术结合支持向量机模型可将肾毒性小分子代谢物更加灵敏、快速、准确地用于中药肾脏毒性评价, 对于临床药源性肾损伤的防治具有重要意义。

关键词: 代谢组学; 支持向量机; 肾毒性; UPLC/Q-TOF-MS; 雷公藤; 马钱子; 广防己; 大黄; 苍耳子

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)04-0472-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.04.007

Applicability of small molecule biomarkers of nephrotoxicity in evaluating toxicity of traditional Chinese medicines

GUO Xue-jun¹, GU Cai-yun¹, XU Yan-yan¹, LI Yu-bo¹, ZHANG Yan-jun²

1. College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To evaluate the applicability of small molecular markers of nephrotoxicity that in prediction of drug toxicity. **Method** Extracts of five kinds of traditional Chinese medicines (*Tripterygium wilfordii*, *Strychni semen*, *Aristolochia fangchi*, *Rhei Radix et Rhizoma*, and *Xanthium sibiricum*) that had known as nephrotoxicity were ig given to rats to establish renal injury models, and the blood samples were collected after administration for 1 and 7 d. Then blood samples were analyzed by UPLC/Q-TOF-MS for five kinds of small molecule biomarkers—thymidine, lyso-phosphatidylcholine (LPC 16:1), LPC(18:4), LPC(20:5), and LPC(22:5). The support vector machine (SVM) prediction model was established to determine the toxicity. The levels of Cr and BUN in serum were determined by automatic biochemical analyzer. The rats in each group were sacrificed after blood collection, and the kidneys were taken for HE staining. **Result** No toxicity was observed in the control group, and the biochemical test results showed no renal injury after mentioned five kinds Chinese herbs were given for 1 d, while SVM model of nephrotoxicity had been found abnormal. After administration for 7 d, the results of SVM model show renal toxicity, which were consistent with biochemical and pathological examination. **Conclusion** Metabonomics combined with the earlier established SVM model enabled prediction of drug nephrotoxicity more sensitively, quickly and accurately, and it is of great significance for the discovery of drug toxicity as well as the prevention and treatment of drug-induced renal injuries in clinic.

Key words: metabonomics; support vector machine model; nephrotoxicity; UPLC/Q-TOF-MS; *Tripterygium wilfordii*; *Strychni semen*; *Aristolochia fangchi*; *Rhei Radix et Rhizoma*; *Xanthium sibiricum*

收稿日期: 2017-01-13

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2011BAI07B08); 国家自然科学基金资助项目(81573835)

作者简介: 郭雪君(1991—), 女, 药物分析硕士研究生, 研究方向为药物代谢。E-mail: guoxuejing666@126.com

*通信作者 张艳军, 博士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: zysunye@163.com

自1993年 Vanherweghem 等在 Lancet 报道服用中药防己、厚朴与急性肾间质纤维化有关^[1], 类似的报道就开始引起国内外学者的广泛关注^[2-3]。同时, 据统计, 近年来急性肾衰病人中约25%是由药物肾损伤引起, 已严重威胁人类的健康^[4]。因此, 中药引起肾病受到广泛关注, 同时中药安全性问题也被提到前所未有的认识高度^[5]。

血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)是临床常用的肾功能评价指标, 然而其在临床检测中缺乏灵敏性和准确度^[6-7], 不利于肾毒性的早期检测和诊断。因此, 亟需发现灵敏、专属、准确的药物肾毒性早期评价指标。因代谢组学具有高通量、特异、快速的特点, 本课题组尝试将代谢组学运用到药物毒性研究中。但是代谢组学会产生大量和多维的数据, 因此课题组采用支持向量机(SVM)对药物肾毒性代谢组学研究的实验数据进行分析。由于SVM的最终决策函数只由少数的支持向量确定, 少数支持向量决定了最终结果, 有助于抓住关键样本、“剔除”大量冗余样本, 该方法简单方便, 使药物肾脏毒性的研究结果更为可靠^[8]。

在前期研究中, 本课题组发现胸苷、溶血磷脂酰胆碱LPC(16:1)、LPC(18:4)、LPC(20:5)和LPC(22:5)5个专属性强的肾脏毒性生物标志物, 并建立了SVM预测模型, 发现其具备较好的灵敏度和特异性^[9]。本实验基于前期筛选到的肾脏毒性生物标志物, 以已知具有肾毒性的雷公藤、马钱子、广防己、大黄和苍耳子ig给予大鼠建立肾脏损伤模型, 进行代谢组学研究, 同时结合生化指标及组织病理学检查结果对给药后的肾脏毒性进行综合评价, 并与肾毒性SVM模型的预测结果进行对比, 以验证上述肾毒性代谢小分子标志物在中药肾毒性预测中的可应用性, 为中药肾脏毒性评价提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性Wistar大鼠60只, 体质量(200±10)g, 由维通利华(北京)实验动物科技有限公司提供, 实验动物生产许可证号为SCXK(京)2012-0001, 饲养于天津市放射研究所实验动物中心SPF级动物实验室。饲养环境条件控制为12h昼夜更替, 温度(23±2)℃, 湿度(35±5)%, 经过一周的适应性饲养后用于实验。

1.2 主要仪器

全自动生化仪 7020 (日本日立公司); ALLLE GRATM-64R 高速离心机 (美国 Beckman 公司); KQ-300DV 型数控超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); XK96-A 快速混匀器 (姜堰市新康医疗器械有限公司); Waters Acquity UPLC 液相色谱仪、Waters Xevo G2 Q-TOF 质谱仪 (美国 Waters 公司)。

1.3 药品及主要试剂

雷公藤 *Tripterygium wilfordii*、大黄 *Rhei Radix et Rhizoma* 和苍耳子 *Xanthium sibiricum* (河北祁一堂药业有限公司, 批号分别为1404266、1409006和1409081), 马钱子 *Strychni semen* (安国圣山药业有限公司, 批号为141018), 广防己 *Aristolochia fangchi* (河北安国中药材批发市场, 批号为141126), 药材均经天津中医药大学胡静副教授鉴定。生理盐水 (山东齐都药业有限公司); 乙腈 (HPLC 纯, 瑞典 Oceanpak 公司); 甲酸 (HPLC 纯, 美国 ROE 公司); 纯净水 (杭州娃哈哈公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

称取上述5种中药, 加10倍量水浸泡30min后, 水浴加热回流提取1h(煮沸), 8层纱布滤过, 滤渣加入8倍量水再次提取1h, 静置10min, 8层纱布滤过, 合并2次滤液, 减压回收溶剂并定容。

Wistar 大鼠随机分为6组, 分别为对照组、雷公藤组、马钱子组、广防己组、大黄组和苍耳子组。根据10~25倍不等的临床给药剂量, 通过体表面积折算得出各组大鼠的给药剂量: 雷公藤60g/kg、马钱子0.1g/kg、广防己30g/kg、大黄28g/kg、苍耳子45g/kg(以生药计), 对照组给予等体积的生理盐水, 均连续ig给药7d。

2.2 样品采集与处理

2.2.1 血样的采集与保存 各组大鼠分别于给药1、7d后, 腹主动脉取血10mL, 其中5mL置肝素化试管中, 3000r/min离心15min后取上清液即得血浆, 置-80℃冰箱中储存, 用于代谢组学研究。另5mL全血经3500r/min离心15min后取上清液即为血清, 置-80℃冰箱中储存, 用于生化指标检测。

2.2.2 肾脏组织采集与处理 各组大鼠于取血后分别处死, 迅速取肾脏, 将其浸泡于10%甲醛溶液中保存, 经HE染色观察病理组织变化。

2.3 生化指标检测组织学评价

利用全自动生化仪测定血清中 Cr 和 BUN 的水平。将肾脏组织进行 HE 染色,石蜡切片经二甲苯脱蜡、水化、苏木素染色 10 min、分化、伊红染色、脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片,置于光学显微镜下放大 200 倍观察大鼠肾脏的病理表现,观察药物对肾脏组织的损伤情况。

2.4 血浆代谢组学研究

2.4.1 血浆样品的制备 取 200 μ L 血浆,加入 600 μ L 乙腈,涡旋混匀 1 min,冰水浴超声 10 min,以 13 000 r/min 离心 15 min,移取上清液进样,进行 UPLC/Q-TOF-MS 分析。

从每组中分别吸取等量血浆样品于离心管中,涡旋混匀 1 min,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液作为质控 (quality control, QC) 样品,同法处理进样。

2.4.2 UPLC/Q-TOF-MS 分析条件^[8] 色谱柱为 Waters UPLC HSS C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司);柱温为 40 $^{\circ}$ C;流动相为 0.1%甲酸水 (A) - 乙腈 (B, 含 0.1%甲酸);体积流量 0.3 mL/min;采用梯度洗脱,洗脱条件为:0~0.5 min, 99% A; 0.5~2 min, 99%~50% A; 2~9 min, 50%~1% A; 9~10 min, 1% A; 10~10.5 min, 1%~99% A; 10.5~12 min, 99% A, 进样量 5 μ L。

采用电喷雾电离 (ESI) 源,在正离子模式下进行质谱分析。使用高纯 N₂ 作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体,干燥气体流量 10 mL/min, N₂ 温度设定 350 $^{\circ}$ C,雾化气气压 310 kPa,脱溶剂氮气体积流量为 600 L/h,锥孔反吹氮气体积流量为 50 L/h。毛细管电离电压 2.1 kV,四极杆扫描范围为 m/z 50~1 000。

2.4.3 方法学考察 取同一 QC 样品溶液,连续进样 6 次,随机选取 20 个色谱峰,考察色谱峰峰面积和保留时间的一致性,分别计算 20 个色谱峰的峰面积和保留时间的 RSD,考察仪器精密度。

平行制备 6 份 QC 样品溶液,连续进样分析,随机选取 20 个色谱峰,计算 20 个色谱峰峰面积和保留时间的 RSD,考察方法精密度。

取同一 QC 样品溶液,分别在 0、6、12、18、24 h 进样分析,随机选取 20 个色谱峰,计算 20 个色谱峰峰面积和保留时间的 RSD,考察样品稳定性。

2.5 肾毒性 SVM 模型适用性考察

根据前期发现的 5 个生物标志物[胸苷、LPC (16:1)、LPC (18:4)、LPC (20:5) 和 LPC (22:5)],通过其 m/z 值以及保留时间,从导出的代谢组学数据中,筛选出肾脏毒性专属的生物标志物。结合前期建立的肾脏毒性生物标志物的 SVM 预测模型,采用 MATLAB (MATLAB R2010a, USA) 以 5 个专属性强的肾脏毒性生物标志物的响应值作为 SVM 的输入变量,对 5 种肾毒性中药建立的动物模型进行肾脏毒性的预测,并与生化指标检测和病理组织学评价结果进行对比,验证肾脏毒性生物标志物在中药肾毒性评价中的适用性。

3 结果

3.1 生化结果

如图 1 所示,给药 1 d 后,5 个给药组的生化检测结果均未出现异常;而给药 7 d 后,与对照组比较,雷公藤组、马钱子组、大黄组、苍耳子组和广防己组的 Cr 和 BUN 水平均有显著差异。除苍耳子组外,其他各给药组的两种指标水平均上升,表现出明显的肾脏毒性。

3.2 肾脏病理组织观察

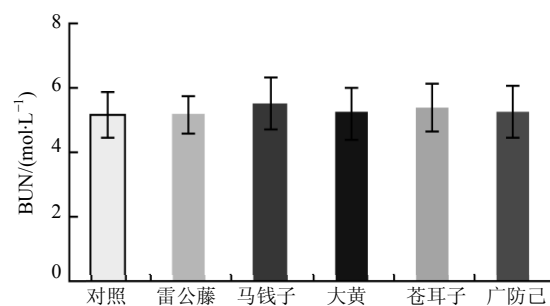
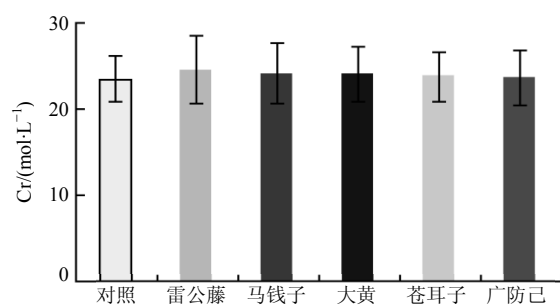
组织学病理切片作为金标准,能够直观地反映出器官受到损害的程度^[10-11]。给药 1 d 后,5 个给药组的组织病理学结果均未见异常;给药 7 d 后,病理组织学结果 (图 2) 显示,对照组的肾脏没有出现明显的损伤,给药组的肾脏与对照组比较,均出现不同程度的间质疏松及炎细胞浸润,近曲、远曲小管萎缩伴扩张,肾盂轻度扩张等,表明雷公藤、马钱子、大黄、苍耳子和广防己在本实验造模条件下的确造成了一定程度的肾脏损害。

3.3 SVM 模型肾毒性预测结果

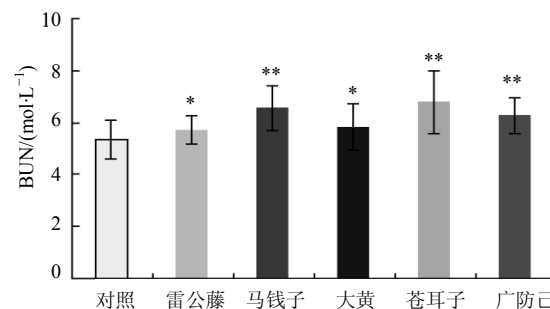
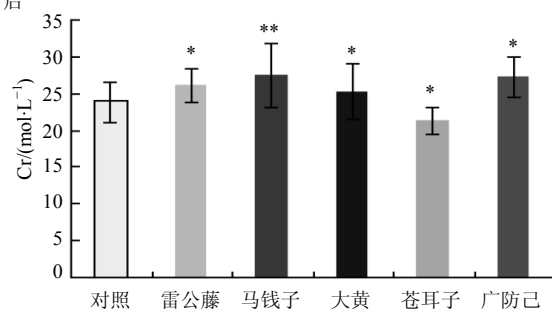
3.3.1 方法专属性 在本实验优化的色谱分离条件和样品前处理方法下,仍存在一定的化合物背景与基质干扰,在总离子流图 (TIC) 和基峰色谱图 (BPC) 中均无法直观显示所有生物标志物的色谱峰,图 3 为各标志物的提取离子流图 (EIC, 加粗显示)。经软件数据处理后可获得各化合物的保留时间与峰面积信息,图 4 为 QC 样品的典型色谱图。

3.3.2 方法学考察 经过仪器精密试验、方法精密度和样品稳定性试验,结果显示色谱峰的峰面积 RSD<10.0%,保留时间 RSD<0.91%,表明仪器精密度良好,方法精密度良好,样品在 24 h 内稳定。

给药 1 d 后



给药 7 d 后



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

图 1 肾脏毒性生化指标的变化

Fig. 1 Changes of biochemical indexes of nephrotoxicity

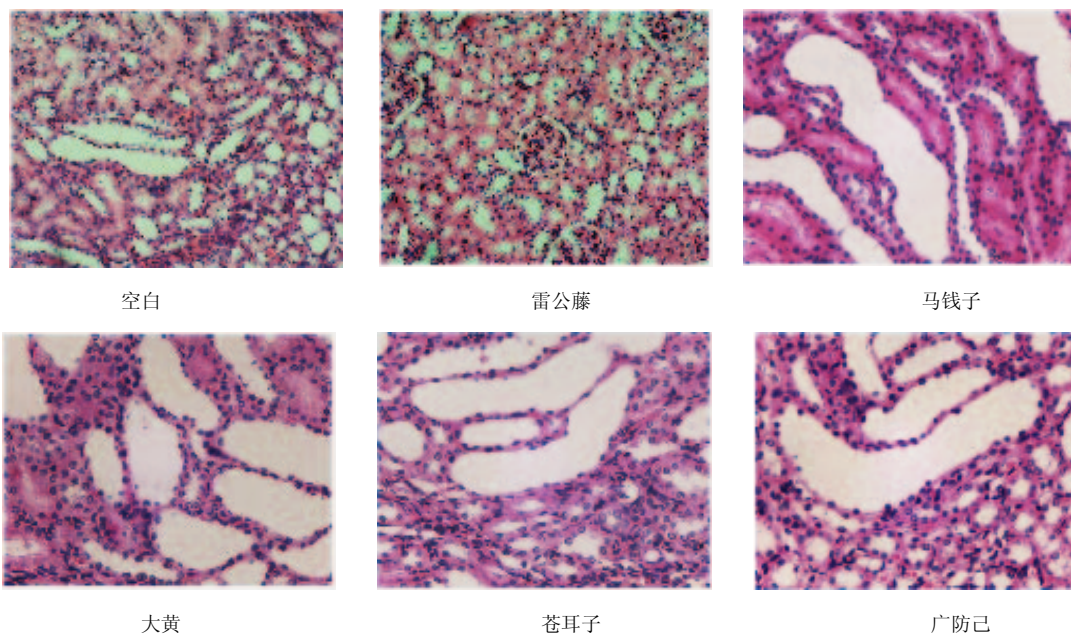


图 2 肾脏组织病理切片

Fig. 2 Pathological section of kidney tissue

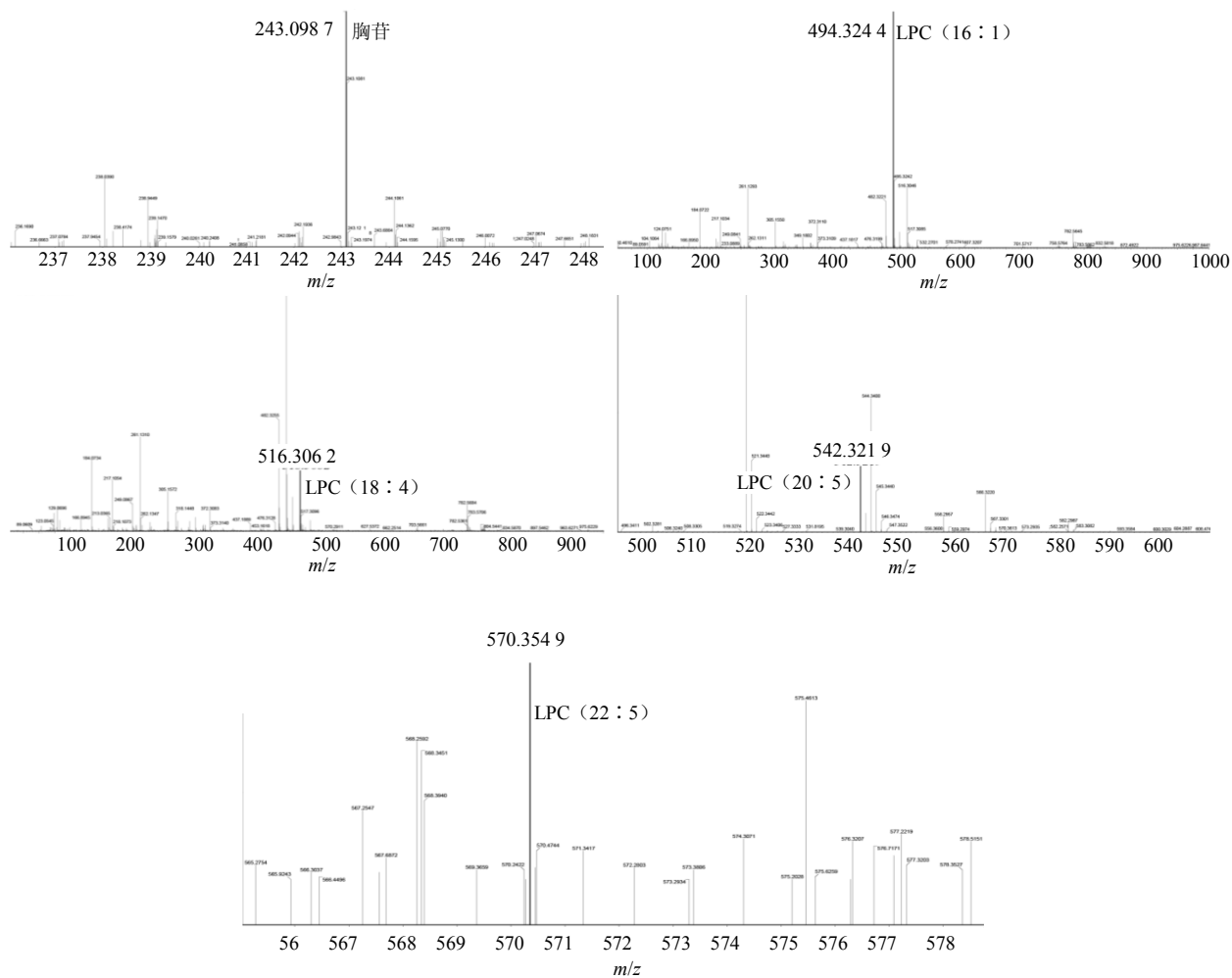


图 3 各标志物的 EIC
Fig. 3 EIC of each marker

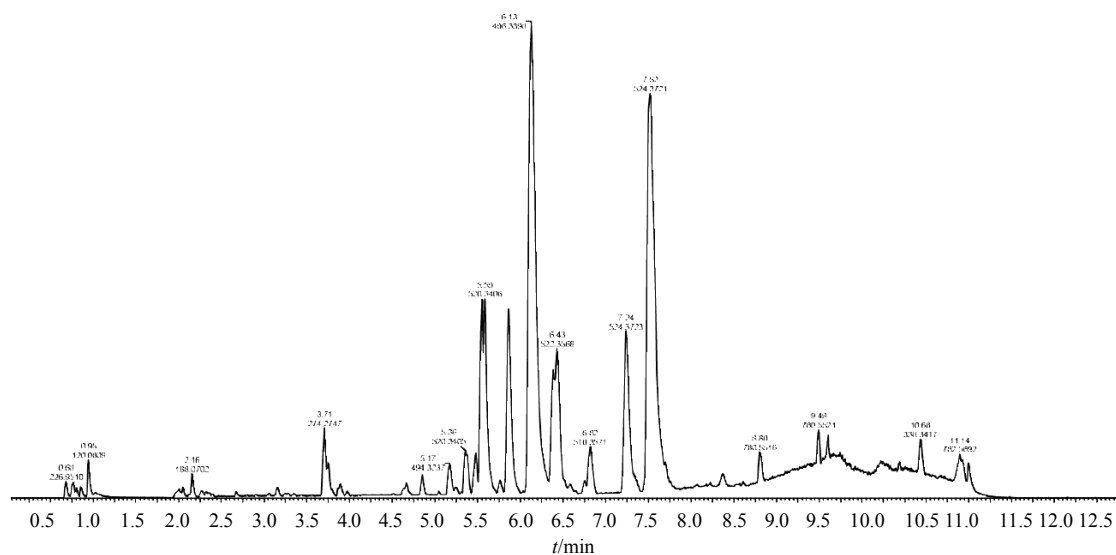


图 4 QC 样品的典型色谱图
Fig. 4 Typical chromatogram of QC sample

3.3.3 肾脏毒性生物标志物数据的提取 在前期的实验中,已确定了5种专属性强的肾脏毒性生物标志物,在本实验中筛选提取这些生物标志物数据,提取条件见表1,结果见表2。

3.3.4 SVM 预测不同中药的肾毒性 以5个肾毒性生物标志物在各组中的响应值的平均值为测试集,建立SVM预测模型见图5。采用每个给药组的平均值进行肾毒性预测,可以整体地考察该模型是

表1 肾脏毒性标志物的信息

Table 1 Information of markers of nephrotoxicity

代谢物	t_R/min	m/z 值
胸苷	2.5	243.098 7
LPC (16:1)	5.2	494.324 4
LPC (18:4)	5.2	516.306 2
LPC (20:5)	5.6	542.321 9
LPC (22:5)	6.1	570.354 9

表2 肾脏毒性标志物变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Changes of markers of nephrotoxicity ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药后/d	胸苷	LPC (16:1)	LPC (18:4)	LPC (20:5)	LPC (22:5)
对照	—	213.22±67.94	12 325.74±3832.35	3 564.44±1008.81	7 230.80±2025.50	254.86±81.52
雷公藤	1	50.42±19.57**	6 142.34±1 852.94**	1 392.88±533.72**	5 921.98±801.57	4.09±1.51**
	7	74.83±35.03**	9 142.34±3 849.58	2 389.52±518.05*	7 366.42±1667.12	21.29±7.11**
马钱子	1	91.69±41.12**	8 044.02±1 450.92**	2 127.83±373.71**	4 953.59±2129.10	5.24±1.70**
	7	111.69±41.58*	13 544.02±6 401.88	3 840.33±367.50	5 884.74±962.53	14.71±6.34*
大黄	1	8.67±4.80**	7 106.53±1 145.88**	1 787.11±364.49**	5 631.01±983.51*	10.15±3.51**
	7	10.10±4.37**	9 677.96±3 011.36	2 501.40±1 064.44	8 202.43±3125.82	27.98±9.08*
苍耳子	1	85.32±23.04**	5 015.26±1 874.90**	1 301.22±296.13**	4 068.99±598.82**	3.56±1.40**
	7	134.08±38.44*	7 500.09±2 816.08	1 909.22±771.38	5 874.71±1198.75	4.42±1.58**
广防己	1	73.89±26.73**	7 505.28±1 884.93**	1 959.39±607.60**	5 732.15±2019.15	14.03±5.72**
	7	121.04±25.64*	1 0219.56±2 340.13	2 530.81±497.72	6 017.86±1245.78	29.74±9.34*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

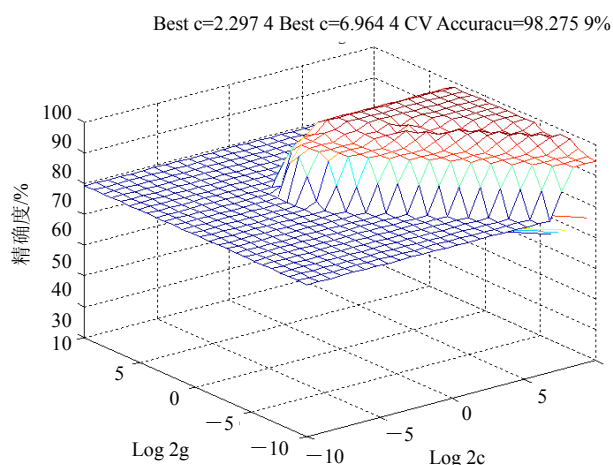


图5 SVM模型的三维视图

Fig. 5 Three-dimensional view of SVM model

否具有肾毒性,避免了单一样本对整体结果的影响。SVM模型预测结果见表3,显示雷公藤、马钱子、大黄、苍耳子和广防己各给药组在不同的时间点均具有肾毒性。

SVM模型预测结果与生化检测、病理观察结果

的比较见表3。由表可知,SVM模型预测在给药1、7 d后,预测出雷公藤、马钱子、大黄、苍耳子和广防己各给药组均产生肾脏毒性,该结果与给药7 d后的生化和病理结果一致;而给药1 d后,生化和病理结果均未表现出明显的肾脏损伤,表明肾毒性小分子代谢物的SVM预测模型较传统的生化和病理检测结果更加灵敏、准确,可以用于中药毒性的早期预测。

4 讨论

本实验选取Cr和BUN作为生化指标,通过与对照组比较,观察其水平变化,来评价5种中药的肾脏毒性。结果显示,给药1 d后,各给药组均未出现明显的肾脏损伤,而给药7 d后,与对照组比较,除苍耳子组外,各给药组的两种指标水平均上升,具出明显的肾脏毒性。这与任红兵等^[12]关于大黄总蒽醌对大鼠急性肾毒性研究的实验结果,梁琦等^[13]关于广防己对肾脏毒性的实验结果以及常丽娟等^[14]关于雷公藤对大鼠肾毒性的血清代谢组学的实验结果均一致。

表3 5种中药SVM肾脏毒性预测结果

Table 3 SVM renal toxicity prediction for different traditional Chinese medicines

中药	给药1 d后			给药7 d后结果		
	生化结果	病理结果	SVM 预测结果	生化结果	病理结果	SVM 预测结果
雷公藤	0	0	1	1	1	1
马钱子	0	0	1	1	1	1
大黄	0	0	1	1	1	1
苍耳子	0	0	1	0	1	1
广防己	0	0	1	1	1	1

“0”: 表示没有肾脏毒性; “1”: 表示具有肾脏毒性

"0": no renal toxicity; "1": renal toxicity

以筛选的药物肾毒性生物标志物为指标, 以建立肾毒性 SVM 预测模型为依据, 建立了更加灵敏、快速和准确的肾毒性预测与判别方法, 实现了药物肾毒性代谢组学生物标志物在中药毒性预测以及判别中的应用。以已知肾毒性中药雷公藤、马钱子、大黄、苍耳子和广防己为例, 来考察肾毒性小分子 SVM 预测模型的可应用性。结果表明 5 种中药在不同时间点具有肾毒性, 然而生化和病理检测结果表明, 给药 1 d 后 5 种中药未引起明显的肾损伤, 表明这 5 个肾毒性生物标志物具有较高的准确率和较好的专属性, 可以更灵敏, 更快速检测早期肾毒性, 并能清楚地判断药物是否具有肾毒性, 为药物的安全性评价提供了新的思路。

参考文献

- [1] Vanherweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapid progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. Lancet, 1993, 341(8842): 387-391.
- [2] Van Biesen W, Vanholdor R, Lameire N. Defining acute renal failure: RIFLE and beyond [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2006, 1(6): 1314-1319.
- [3] 王悦, 范敏华. 住院患者中急性肾功能衰竭的流行病学和病因学分析 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 16(2): 117-120.
- [4] 王京丽, 周超凡. 中草药及其制剂的肾毒性概述 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(3): 437-439.
- [5] 郭晓, 王萌, 朱彦, 等. 中药肾毒性机制研究现状及评价方法研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3581-3591.
- [6] Kim K B, Um S Y, Chung M W, et al. Choi. Toxicometabolomics approach to urinary biomarkers for mercuric chloride (HgCl₂)-induced nephrotoxicity using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 249(2): 114-126.
- [7] Han W K, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury [J]. Kidney Int, 2002, 62(1): 237-244.
- [8] 陈永义, 俞小鼎, 高学浩. 处理非线性分类和回归问题的一种新方法(I)—支持向量机方法简介 [J]. 应用气相色谱, 2004, 15(3): 345-354.
- [9] Li Y B, Deng H Y, Ju L, et al. Screening and validation for plasma biomarkers of nephrotoxicity based on metabolomics in male rats [J]. Toxicol Res, 2016, 5(1): 259-267.
- [10] Portilla D, Li S, Nagothu K K, et al. Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Kidney Int, 2006, 69(12): 2194-2204.
- [11] Ni Y, Su M, Qiu Y, et al. Metabolic profiling using combined GC-MS and LC-MS provides a systems understanding of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rat [J]. FEBS Lett, 2007, 581(4): 707-711.
- [12] 任红兵, 王艳艳, 王团结. 大黄总蒽醌对大鼠急性肾毒性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(1): 69-71.
- [13] 梁琦, 倪诚, 谢鸣. 广防己的肾毒性及代谢组学研究 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(8): 746-752.
- [14] 常丽娟, 李佐静, 李清, 等. 雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂杂志, 2016, 22(24): 89-94.