

整合血清代谢组学和网络毒理学探究大青叶肾毒性成分及机制

韩苏日古嘎^{1,2}, 乌日拉嘎^{1,2}, 杨立国^{1,2*}

1. 内蒙古民族大学 蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000

2. 蒙药研发国家地方联合工程研究中心, 内蒙古 通辽 028000

摘要: **目的** 通过整合血清代谢组学和网络毒理学, 探究大青叶肾毒性成分及机制。**方法** 采用大鼠连续 90 d 给药评价大青叶肾毒性作用。通过血清代谢组学寻找差异代谢物及代谢通路; 采用网络毒理学分析大青叶潜在肾毒性成分和靶点; 整合血清代谢组学和网络毒理学, 构建“成分-靶点-代谢物-代谢通路”网络。**结果** 大青叶具有一定肾毒性。血清代谢组学结果显示 67 个代谢物水平发生显著变化, 涉及 5 条主要代谢通路; 网络毒理学筛选出 32 个毒性成分, 对应靶点 422 个, 相关通路 189 条。整合分析筛选出左旋樟脑、牻牛儿苗二酮、正辛醛、(-)- α -蒎烯、靛蓝、十四烷等 6 个毒性成分, 作用于 PTGS2、PTGS1、SRC、CYP2A6、CYP1A2、CYP1A1 等 27 个靶点, 干扰柠檬酸、花生四烯酸、白三烯 C4、吡哆醇 4 种代谢物, 影响丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 花生四烯酸代谢, 氨基酸生物合成, 维生素 B6 代谢 4 条代谢通路。**结论** 结合血清代谢组学和网络毒理学初步阐明了大青叶肾毒性成分及机制, 为大青叶临床安全合理应用提供了参考。

关键词: 大青叶; 肾毒性; 代谢组学; 网络毒理学; 左旋樟脑; 牻牛儿苗二酮; 正辛醛; (-)- α -蒎烯; 靛蓝; 十四烷

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)09-2518-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.013

Nephrotoxic components and mechanisms of *Isatidis Folium* based on integrated serum metabolomics and network toxicology

HAN Suriguga^{1,2}, Wurilaga^{1,2}, YANG Liguol^{1,2}

1. College of Mongolian Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China

2. National and Local Joint Engineering Research Center for Mongolian Medicine Research and Development, Tongliao 028000, China

Abstract: Objective To explore nephrotoxic components and mechanisms of *Isatidis Folium* (IF) by integrating serum metabolomics and network toxicology. **Methods** The nephrotoxic effect of IF was evaluated by continuous administration in rats for 90 d. Search for differential metabolites and metabolic pathways through serum metabolomics. The potential nephrotoxic components and targets of IF were analyzed by network toxicology. Integrate serum metabolomics and network toxicology to construct a "component-target-metabolite-metabolic pathway" network. **Results** IF has certain nephrotoxicity. The results of serum metabolomics showed significant changes in the levels of 67 metabolites, involving five major metabolic pathways. Network toxicology screened out 32 toxic components, corresponding to 422 targets and 189 related pathways. Integrated analysis screened out six toxic components, including *L*-camphor, wrightiadione, octanal, (-)- α -pinene, indigo and tetradecane, which could act on 27 targets, including PTGS2, PTGS1, SRC, CYP2A6, CYP1A2, CYP1A1, etc. These targets interfered with the metabolism of citric acid, arachidonic acid, leukotriene C4, pyridoxine, and affected four key metabolic pathways of alanine, aspartate and glutamate metabolism, arachidonic acid metabolism, biosynthesis of amino acids, and vitamin B6 metabolism. **Conclusion** Combined with serum metabolomics and network toxicology, the components and mechanisms of nephrotoxicity of IF were elucidated, which provided reference for safe and rational clinical application of IF.

Key words: *Isatidis Folium*; nephrotoxicity; metabolomics; network toxicology; *L*-camphor; wrightiadione; octanal; (-)- α -pinene; indigo; tetradecane

近年来,随着中药在世界各地受到重视,中药安全性问题日益突出^[1]。由于对中药安全性问题认识不足,中药药源性毒性事件逐年增多,尤其是中药引

起的肾毒性^[2]。大青叶为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* L. 的干燥叶,临床上用于温病高热、神昏、发斑发疹、疟腮等症,是《中国药典》2020 年版收

收稿日期: 2025-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(82260681); 蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放基金资助项目(MDK2025004)

作者简介: 韩苏日古嘎(2001—),女,蒙古族,硕士研究生,主要从事蒙药毒理学研究。E-mail: Svemi000@qq.com

*通信作者: 杨立国(1985—),男,副教授,硕士生导师,主要从事蒙药化学成分研究。E-mail: yangliguo5366@163.com

载的常用的清热解毒类中药^[3]。大青叶史载于《名医别录》，被列为中品，谓之“味苦，大寒，无毒”^[4]，但近年来其肾毒性被不断认识，肾毒性相关报道日益增多^[5-7]，曾有患者应用大青叶后引起血尿反应的报道^[8]。然而，大青叶肾毒性成分及机制迄今未明，此问题关系到大青叶的临床应用及用药安全，有必要弄清楚。

代谢组学可从整体水平阐述生物体染毒时内源性小分子代谢物的变化，从而为识别药物毒性机制提供证据，这与中医药的“整体观”思想不谋而合^[9]。网络毒理学可通过分析毒性-靶点-药物之间的相互作用，推测中药毒性成分及机制，为中药安全性评价提供理论依据和技术支持^[10]。本研究采用代谢组学筛选差异代谢物和相关代谢通路，通过网络毒理学筛选大青叶潜在毒性成分和靶点，整合代谢组学和网络毒理学构建成分-靶点-代谢物-代谢通路网络，初步阐明大青叶肾毒性成分及机制，以期为大青叶的临床安全合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 18 只，体质量 (180 ± 20) g，由辽宁长生生物技术公司提供，许可证号为 SCXK (辽) 2020-0001；饲养于内蒙古民族大学动物实验中心，12 h 光照/黑暗循环，室温 (23 ± 2) °C，湿度 (55 ± 5) %，实验前适应性饲养 1 周；本研究动物实验经内蒙古民族大学实验动物伦理委员会批准 (20240301)。

1.2 药物与试剂

大青叶 (批号 C016230801) 由河北安嘉药业有限公司提供，经内蒙古民族大学包桂花教授鉴定为菘蓝 *Isatis indigotica* L. 的干燥叶；甲醇、乙腈、甲酸均为质谱纯 (Thermo Fisher 公司)；超纯水由 Milli-Q 纯水仪 (Millipore 公司) 制备；肾损伤分子 1 (KIM-1) 试剂盒 (批号 BY-ER330751)、胱抑素 C (Cys-C) 试剂盒 (批号 BY-ER330230) 购自南京博研生物科技有限公司。

1.3 仪器

Vanquish 超高效液相色谱仪和 Q Exactive 高分辨质谱仪 (Thermo Fisher 公司)；ME104 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司)；SIGMA 3K15 高速离心机 (Sigma 公司)；Synergy II 型酶标仪 (Biotek 公司)。

1.4 动物实验各组给药与样品收集

《中国药典》2020 年版记载大青叶的人临床最

大用量为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，大鼠等效剂量为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本研究参考相关文献报道^[11]设置 2 个剂量：大青叶生药 20、 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，分别是人临床最大剂量 (即大鼠等效剂量) 的 13.3、26.7 倍。预试验结果显示大青叶提取物出膏率约为 25%，即按大青叶提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给予大鼠。

大青叶药材 3 kg，12 倍量 70% 乙醇浸泡过夜，回流提取 2 次，每次 2 h，滤过，浓缩，干燥得大青叶提取物。18 只 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后，随机分为大青叶提取物高、低剂量 (10 、 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、对照组 (等体积 0.3% CMC-Na 溶液)，每组 6 只，连续 ig 给药 90 d。实验结束后，大鼠腹主动脉采血， $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，得上层血清。根据试剂盒说明书检测各组大鼠血清中 KIM-1 和 Cys-C 的含量。另取各组大鼠肾组织，4% 多聚甲醛固定，包埋，切片，苏木素-伊红 (HE) 染色后光学显微镜下观察。

1.5 血清代谢组学样本处理

血清样本解冻后，取 $100 \mu\text{L}$ 加入 80% 甲醇 $500 \mu\text{L}$ ，涡旋，冰浴 5 min， $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，取 $300 \mu\text{L}$ 上清液，真空冷冻干燥，50% 甲醇复溶，涡旋， $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，取上清液进样分析。质量控制 (QC) 样本由所有样本提取液等体积混合而成。

1.6 LC-MS 分析条件

采用 Hypesil Gold C₁₈ 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ， $1.9 \mu\text{m}$)，以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-甲醇 (B) 为流动相，梯度洗脱 (0~1.5 min，2% B；1.5~3 min，2%~85% B；3~10 min，85%~100% B；10~11 min，100%~2% B；11~12 min，2% B)，体积流量 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱温 40 °C，进样量 $5 \mu\text{L}$ 。采用 ESI 电离源，正、负离子模式检测，质谱扫描范围为 m/z 100~1500，喷雾电压 -3.2 kV，气帘气压力 241.32 kPa，干燥器温度 320 °C，鞘气温度 350 °C。

1.7 数据处理与分析

使用 ProteoWizard 软件 (v3.0.8789) 将原始数据转换为 .mzXML 格式，利用 R 语言 (v3.1.3) 进行峰提取、校正、标准化处理。使用 HMDB 数据库 (<https://www.hmdb.ca/>) 鉴定代谢物。使用 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。使用 R 软件包绘制火山图。使用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行代谢通路分析。

1.8 网络毒理学分析

查阅国内外文献汇总大青叶化学成分，利用

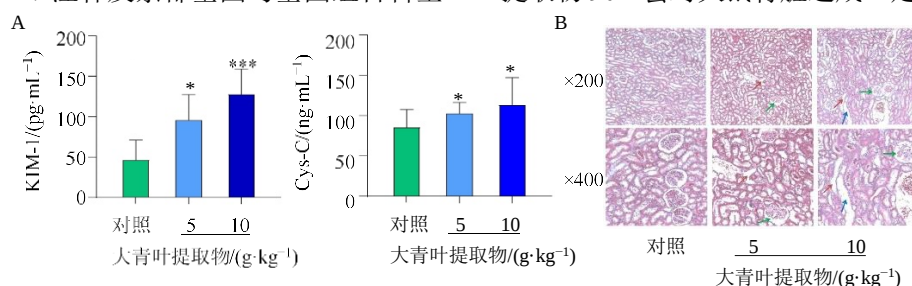
PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索化合物 SMILES 号。通过 admetSAR-3.0 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR3/>) 预测化合物的潜在毒性, 将肾毒性预测概率高于 0.6 的化学成分输入到 CTD (<https://ctdbase.org/>) 数据库得到毒性成分靶点。以“nephrotoxicity”为关键词检索 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、DisGeNet (<https://disgenet.com/>) 数据库, 收集、合并、去重后得到肾毒性靶点。利用 Venn 作图平台得到大青叶毒性成分靶点与肾毒性靶点的交集靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库获得蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 信息, 进一步将数据导入 Cytoscape 3.10.0 软件绘制 PPI 网络。通过微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对潜在靶点进行基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全

书 (KEGG) 通路分析。将成分、靶点、信号通路相互作用数据导入 Cytoscape 3.10.0 构建成分-靶点-通路网络。

2 结果

2.1 大青叶提取物对大鼠肾毒性相关生化指标和组织病理学的影响

相比于肌酐和尿素氮, KIM-1 和 Cys-C 是更为早期、灵敏、特异的肾损伤生物标志物^[12]。如图 1 所示, 与对照组比较, 大青叶提取物低、高剂量组大鼠血清中的 KIM-1、Cys-C 水平均明显升高, 具有显著的统计学差异 ($P < 0.05$ 、 0.001)。组织病理学 HE 染色结果显示, 与对照组相比, 低、高剂量组均出现了不同程度的损伤, 主要表现为部分区域肾小管扩张、胞质空泡化、肾小球轻度萎缩, 提示连续给予大青叶提取物 90 d 会对大鼠肾脏造成一定的损伤。见图 1。



红色箭头-肾小管扩张; 蓝色箭头-胞质空泡化; 绿色箭头-肾小球轻度萎缩; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

Red arrow-dilation of renal tubules; blue arrow-cytoplasmic vacuolization; green arrow-mild glomerular atrophy; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 各组血清生化指标及肾组织病理结果 (HE 染色)

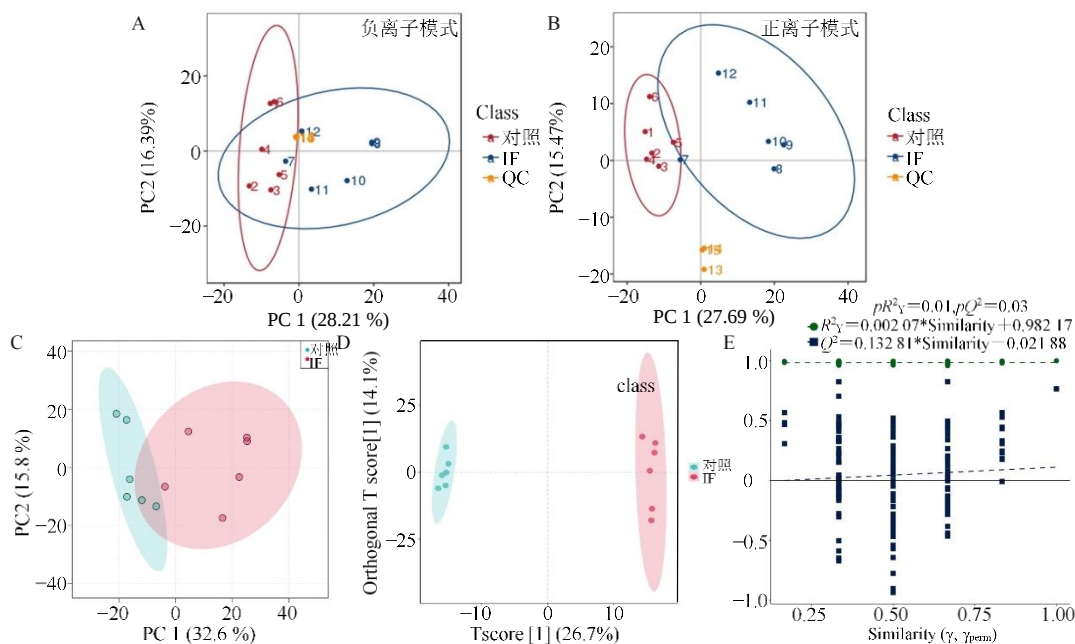
Fig. 1 Serum biochemical indexes and pathological morphology of kidney in each group (HE staining)

2.2 血清代谢组学分析

2.2.1 QC 样本分析与多元统计学分析 PCA 结果显示 QC 样本在正、负离子模式下均聚集在一起 (图 2-A、B), 表明分析系统满足代谢组学试验要求。根据“2.1”项下大青叶肾毒性结果, 选取大青叶提取物高剂量组和对照组大鼠血清样本进行代谢组学研究, 寻找大青叶肾毒性代谢标志物。PCA 结果显示, 对照组 (BC) 和大青叶提取物高剂量组 (IF) 的分组点云存在一定交集, 提示两组间代谢物组成结构差异不够显著 (图 2-C)。进一步采用有监督模式的 OPLS-DA 模型进行分析, 结果显示对照组 (BC) 和大青叶提取物高剂量组 (IF) 的分组点云分布在不同区域, 且置换检验中 pR^2_Y 、 pQ^2 均 < 0.05 , 表明 OPLS-DA 模型判别结果较好, 两组间存在显著差异代谢物 (图 2-D、E)。

2.2.2 差异代谢物和代谢通路分析 根据对照组、大

青叶提取物高剂量组构建的 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 (VIP) 值、变化倍数 (FC) 值、 t 检验的 P 值, 筛选同时满足 $VIP > 1$ 、 $FC > 1$ 、 $P < 0.05$ 的代谢物, 作为差异代谢物并绘制火山图, 见图 3-A、3-B。结合 HMDB、KEGG 等数据库, 共鉴定 67 个差异代谢物。与对照组比较, 大青叶可引起亚精胺、高精氨酸、葫芦巴碱、6-去氧-D-葡萄糖、D-丙氨酰-D-丙氨酸、哌啶酸、4-胍基丁酸、胆色素原、左旋多巴、N-甲酰犬尿氨酸、前列腺素 E2 等 38 个代谢物显著上调; L-谷氨酰胺、甜菜碱、L-瓜氨酸、乙酰胆碱、鸟苷酸、磷酸吡哆胺、炔雌醇、雌酮、四氢皮质酮、20-羧基白三烯 B4 等 29 个代谢物显著下调, 见表 1。MetaboAnalyst 5.0 通路富集分析显示大青叶显著影响维生素 B₆ 代谢, 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢, 氨基酸生物合成, 精氨酸生物合成, 花生四烯酸代谢等 5 条代谢通路, 见图 3-C。

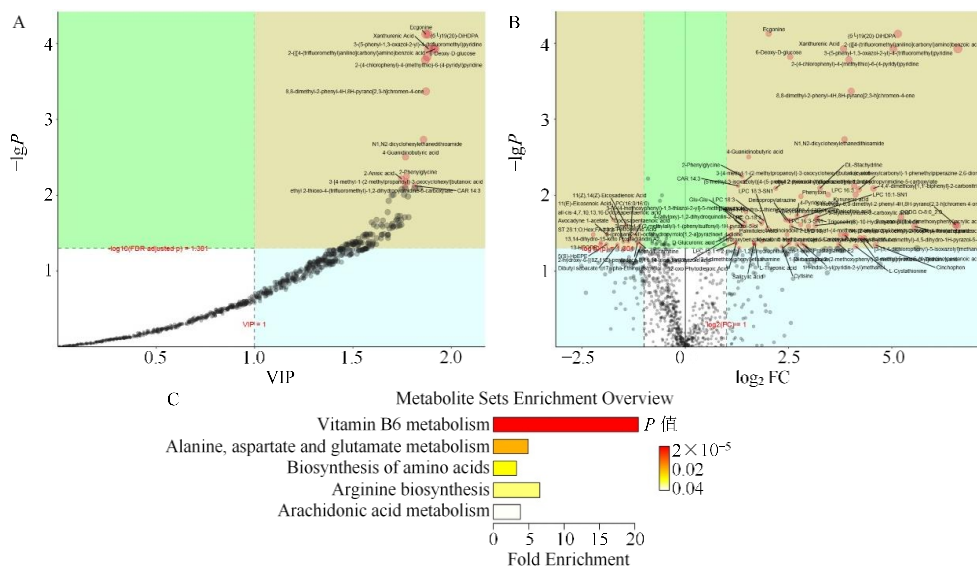


A-QC 样本 PCA 得分图 (负离子模式); B-QC 样本 PCA 得分图 (正离子模式); C-PCA 得分图; D-OPLS-DA 得分图; E-OPLS-DA 模型置换检验图; IF-大青叶高剂量组。

A-PCA score plots of quality control samples in negative mode; B-PCA score plots of quality control samples in positive mode; C-PCA score plots; D-OPLS-DA score plots; E-permutation test plot of the OPLS-DA model; IF-high-dose group of *Isatis Folium*.

图 2 代谢物多元统计分析

Fig. 2 Multivariate analysis metabolites



A-代谢物重要性图; B-火山图; C-代谢通路富集分析图。

A-metabolite importance map; B-volcano plot; C-metabolic pathway enrichment analysis diagram.

图 3 差异代谢物及代谢通路

Fig. 3 Differential metabolites and metabolic pathways

2.3 网络毒理学研究

2.3.1 大青叶潜在肾毒性成分 查询大青叶化学成分相关文献,发现国内外学者已从大青叶中分离

鉴定出 172 个化学成分^[13-15]。采用 admetSAR 3.0 在线评估系统预测上述化学成分的肾毒性,筛选出肾毒性预测概率高于 0.6 的化合物 32 个。见表 2。

表 1 潜在毒性生物标志物
Table 1 Potential toxicity biomarkers

编号	ESI	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	<i>m/z</i>	<i>P</i>	大青叶高剂量组 vs 对照组
1	+	1.25	亚精胺 (spermidine)	C ₇ H ₁₉ N ₃	146.165 8	0.033	↑
2	+	1.27	高精氨酸 (homoarginine)	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	189.135 3	0.040	↑
3	+	1.28	<i>L</i> -谷氨酰胺 (<i>L</i> -glutamine)	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	147.076 9	0.047	↓
4	+	1.30	甜菜碱 (betaine)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.086 9	0.007	↓
5	+	1.31	<i>L</i> -瓜氨酸 (<i>L</i> -citrulline)	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	198.085 6	0.046	↓
6	+	1.36	葫芦巴碱 (trigonelline)	C ₇ H ₇ NO ₂	138.055 4	0.001	↑
7	+	1.37	6-去氧- <i>D</i> -葡萄糖 (6-deoxy- <i>D</i> -glucose)	C ₆ H ₁₂ O ₅	187.058 3	0.000	↑
8	+	1.38	乙酰胆碱 (acetylcholine)	C ₇ H ₁₅ NO ₂	146.118 0	0.040	↓
9	+	1.39	<i>D</i> -丙氨酰- <i>D</i> -丙氨酸 (<i>D</i> -alanyl- <i>D</i> -alanine)	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	161.092 7	0.000	↑
10	+	1.46	哌啶酸 (pipecolic acid)	C ₆ H ₁₁ NO ₂	130.086 8	0.009	↑
11	+	1.83	4-胍基丁酸 (4-guanidinobutyric acid)	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	146.092 9	0.000	↑
12	+	2.98	鸟苷酸 (guanosine monophosphate)	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	364.066 4	0.005	↓
13	+	4.93	胆色素原 (porphobilinogen)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	227.103 3	0.023	↑
14	+	5.05	左旋多巴 (levodopa)	C ₉ H ₁₁ NO ₄	198.076 8	0.011	↑
15	+	5.17	<i>N</i> -甲酰犬尿氨酸 (<i>N</i> -formylkynurenine)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₄	219.077 0	0.043	↑
16	+	5.18	磷酸吡哆胺 (pyridoxamine 5-phosphate)	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₅ P	249.061 8	0.005	↓
17	+	5.28	苯乙酰谷氨酰胺 (phenylacetylglutamine)	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	287.101 4	0.017	↑
18	+	5.40	犬尿酸 (kynurenic acid)	C ₁₀ H ₇ NO ₃	190.050 6	0.000	↑
19	+	5.49	<i>L</i> -胱硫醚 (<i>L</i> -cystathionine)	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	223.075 3	0.006	↑
20	+	5.70	2'-脱氧尿苷 (2'-deoxyuridine)	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	229.081 6	0.013	↑
21	+	5.76	<i>D</i> -泛酸钙 (calcium <i>D</i> -panthotenate)	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	477.175 4	0.024	↑
22	+	5.87	<i>N</i> -乙酰- <i>D</i> -色氨酸 (<i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -tryptophan)	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	247.108 5	0.027	↑
23	+	6.14	<i>D</i> -苯丙氨酸 (<i>D</i> -phenylalanine)	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.086 9	0.025	↑
24	+	6.39	炔雌醇 (ethinyl estradiol)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	297.185 9	0.005	↓
25	+	6.42	雌酮 (estrone)	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	253.159 3	0.020	↓
26	+	6.57	白三烯 C ₄ (leukotriene C ₄)	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₉ S	626.313 4	0.044	↑
27	+	6.69	四氢皮质酮 (tetrahydrocorticosterone)	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	368.280 6	0.001	↓
28	+	6.95	20-羧基白三烯 B ₄ (20-carboxy-leukotriene B ₄)	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	367.210 7	0.012	↓
29	+	7.34	棕榈酸 (palmitoleic acid)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	277.217 0	0.001	↑
30	+	7.49	咖啡醇 (cafestol)	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	317.211 2	0.006	↑
31	+	7.84	13-羟基十八烷基-9,11-二烯酸 (13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	335.220 0	0.008	↓
32	+	8.19	去氢胆酸 (dehydrocholic acid)	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	385.237 2	0.020	↓
33	+	8.88	2-花生四烯酸甘油酯 (2-arachidonoyl glycerol)	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	361.273 9	0.014	↓
34	+	9.03	二十碳三烯酸 (eicosatrienoic acid)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.263 9	0.031	↓
35	+	9.53	油酸酰胺 (oleamide)	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.279 7	0.023	↓
36	+	9.69	辅酶 Q ₂ (coenzyme Q ₂)	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	319.195 3	0.006	↓
37	+	9.74	棕榈酰肉碱 (palmitoylcarnitine)	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	400.343 9	0.017	↓
38	+	9.89	吡哆胺 (pyridoxamine)	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	359.167 6	0.018	↓
39	—	2.18	柠檬酸 (citric acid)	C ₆ H ₈ O ₇	191.0190	0.017	↓
40	—	2.29	4-氧代脯氨酸 (4-oxoproline)	C ₅ H ₇ NO ₃	128.034 3	0.038	↑
41	—	4.60	甲戊二羟酸 (mevalonic acid)	C ₆ H ₁₂ O ₄	147.065 3	0.005	↑
42	—	5.13	4-吡哆酸 (4-pyridoxic acid)	C ₈ H ₉ NO ₄	182.045 1	0.001	↑

表 1 (续)

编号	ESI	t _R /min	成分	分子式	m/z	P	大青叶高剂量组 vs 对照组
43	—	5.16	6-磷酸海藻糖 (trehalose 6-phosphate)	C ₁₂ H ₂₃ O ₁₄ P	421.074 8	0.008	↑
44	—	5.22	吡哆醇 (pyridoxine)	C ₈ H ₁₁ NO ₃	168.065 8	0.038	↑
45	—	5.35	D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid)	C ₆ H ₁₀ O ₇	193.034 6	0.004	↑
46	—	5.39	2-异丙基苹果酸 (2-isopropylmalate)	C ₇ H ₁₂ O ₅	175.060 4	0.025	↑
47	—	5.44	6-磷酸-D-果糖 (D-fructose 6-phosphate)	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	259.021 4	0.007	↑
48	—	5.48	苯丙酮酸 (phenylpyruvic acid)	C ₉ H ₈ O ₃	209.044 8	0.014	↓
49	—	5.58	N-乙酰-L-苯丙氨酸 (N-acetyl-L-phenylalanine)	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	160.076 0	0.043	↑
50	—	5.61	乙酰半胱氨酸 (acetylcysteine)	C ₅ H ₉ NO ₃ S	162.022 3	0.008	↑
51	—	5.62	乙酰肉碱 (acetylcarnitine)	C ₉ H ₁₇ NO ₄	202.107 9	0.014	↑
52	—	5.64	6-磷酸-D-氨基葡萄糖 (D-glucosamine 6-phosphate)	C ₆ H ₁₄ NO ₈ P	258.038 5	0.032	↑
53	—	5.76	3-甲氧基肾上腺素 (metanephrine)	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	196.097 3	0.012	↓
54	—	5.79	前列腺素 E2 (prostaglandin E2)	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	387.202 2	0.003	↑
55	—	5.86	3-羟基苯甲酸 (3-hydroxybenzoic acid)	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 5	0.006	↑
56	—	5.87	2-羟基苯甲酸 (salicylic acid)	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 5	0.006	↑
57	—	6.05	黄尿酸 (xanthurenic acid)	C ₁₀ H ₇ NO ₄	204.029 6	0.000	↑
58	—	6.41	牛黄石胆酸 (tauroolithocholic acid)	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	482.294 3	0.033	↓
59	—	6.51	鼠胆酸 (muricholic acid)	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	407.279 8	0.025	↓
60	—	6.91	L-谷氨酰-L-谷氨酸 (L-glutamyl-L-glutamic acid)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇	275.089 8	0.001	↑
61	—	6.98	去氧胆酸 (deoxycholic acid)	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.284 9	0.025	↓
62	—	7.04	脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone)	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	287.201 2	0.041	↑
63	—	7.51	十六烷二酸 (hexadecanedioic acid)	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	285.206 7	0.025	↓
64	—	8.22	前列腺素 F1α (prostaglandin F1α)	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	355.248 5	0.016	↓
65	—	9.65	花生四烯酸 (arachidonic acid)	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303.232 5	0.045	↓
66	—	10.02	二十二碳五烯酸 (docosapentaenoic acid)	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	329.248 1	0.003	↓
67	—	10.32	肾上腺酸 (adrenic acid)	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	331.263 7	0.019	↓

↑-上调; ↓-下调。

↑-upregulated; ↓-down-regulated.

表 2 大青叶化学成分肾毒性预测结果

Table 2 Prediction results of nephrotoxicity of chemical components in *Isatidis Folium*

编号	成分	分子式	类别	预测概率
1	苯甲醛 (benzaldehyde)	C ₇ H ₆ O	芳香醛	0.871
2	色胺酮 (tryptanthrin)	C ₁₅ H ₈ N ₂ O ₂	生物碱	0.850
3	2-[4-氧代-3(4H)-喹唑啉基] 苯甲酸甲酯[methyl 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) benzoate]	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	生物碱	0.847
4	腺苷 (adenosine)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	核苷	0.835
5	脲木二酮 (wrightiadiene)	C ₁₆ H ₈ O ₃	异黄酮	0.834
6	(-)-α-蒎烯[(-)-α-pinene]	C ₁₀ H ₁₆	单萜	0.823
7	苯乙醛 (phenylacetaldehyde)	C ₈ H ₈ O	芳香醛	0.816
8	鸟苷 (guanosine)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	核苷	0.809
9	肥皂草苷 (saponarin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	黄酮	0.804
10	正癸醛 (decanal)	C ₁₀ H ₂₀ O	脂肪醛	0.792
11	十二烷 (dodecane)	C ₁₂ H ₂₆	烷烃	0.782
12	正壬醛 (nonanal)	C ₉ H ₁₈ O	脂肪醛	0.764
13	靛蓝 (indigo)	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	生物碱	0.748
14	十四烷 (tetradecane)	C ₁₄ H ₃₀	烷烃	0.742
15	4-喹唑酮-2-甲酸乙酯 (ethyl 4-quinazolone-2-carboxylate)	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃	生物碱	0.738

表 2 (续)

编号	成分	分子式	类别	预测概率
16	正辛醛 (octanal)	C ₈ H ₁₆ O	脂肪醛	0.726
17	正己醛 (hexanal)	C ₆ H ₁₂ O	脂肪醛	0.726
18	1-辛烯-3-醇 (1-octen-3-ol)	C ₈ H ₁₆ O	脂肪醇	0.704
19	正庚醛 (heptaldehyde)	C ₇ H ₁₄ O	脂肪醛	0.700
20	1-乙酰双靛蓝 (1-acetylindigotin)	C ₃₄ H ₂₀ N ₄ O ₃	生物碱	0.692
21	3,5-辛二烯-2-酮 (3,5-octadien-2-one)	C ₈ H ₁₂ O	脂肪酮	0.689
22	异牡荆素 (isovitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	黄酮	0.675
23	phaitanthrin D	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₃	生物碱	0.661
24	次黄嘌呤 (hypoxanthine)	C ₅ H ₄ N ₄ O	碱基	0.645
25	亚麻酸乙酯 (ethyl linolenate)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	脂肪酸酯	0.629
26	胞苷 (cytidine)	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	核苷	0.629
27	胸苷 (thymidine)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	核苷	0.625
28	十二烷酸 (lauric acid)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	脂肪酸	0.625
29	左旋樟脑 (L-camphor)	C ₁₀ H ₁₆ O	单萜	0.623
30	clionasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	甾醇	0.615
31	棕榈酸 (palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	脂肪酸	0.608
32	脱氧鸭嘴花酮碱 (deoxyvasicinone)	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	生物碱	0.605

2.3.2 潜在靶点预测及 PPI 网络构建 采用 CTD、SWISS 预测平台共获得 422 个潜在靶点。通过 STRING 数据库构建 PPI 网络,以互作分数 ≥ 0.7 为标准,获取 PPI 网络,并导入 Cytoscape 3.10.0 进行

可视化分析,结果如图 4 所示,按照度 (Degree) 值大小筛选得到 IL6、TP53、TNF、IL1B、STAT3、EGFR、IL10、IFNG、BCL2、ALB 等 10 个核心靶点。

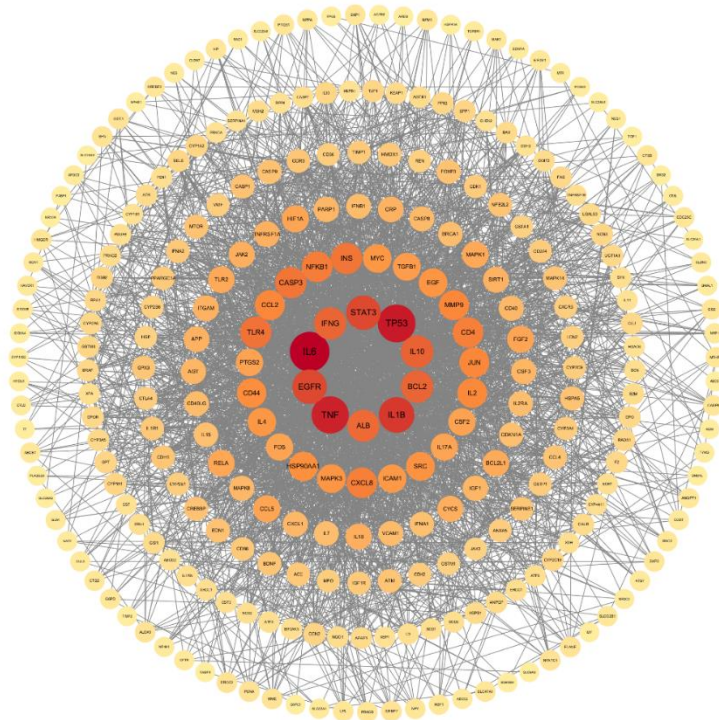


图 4 潜在靶基因的 PPI 网络

Fig. 4 PPI network of potential gene targets

2.3.3 GO 及 KEGG 富集分析 利用微生信在线平台对 422 个靶点进行 GO 生物过程及 KEGG 信号通路分析 (图 5)。共富集到 189 条 KEGG 信号通路, 排在前 20 的信号通路为哮喘、Virion-肝炎病毒、精氨酸和脯氨酸代谢、铁死亡、色氨酸代谢、脂肪细

胞中脂肪分解的调节、胆固醇代谢、甲状腺激素合成、胃酸分泌、B 细胞受体信号通路、黏附连接、氨基酸的生物合成、PPAR 信号通路、黑色素生成、血小板活化、Hippo 信号通路、干细胞多能性调节通路、cGMP-PKG 信号通路、亨廷顿病、代谢途径等。

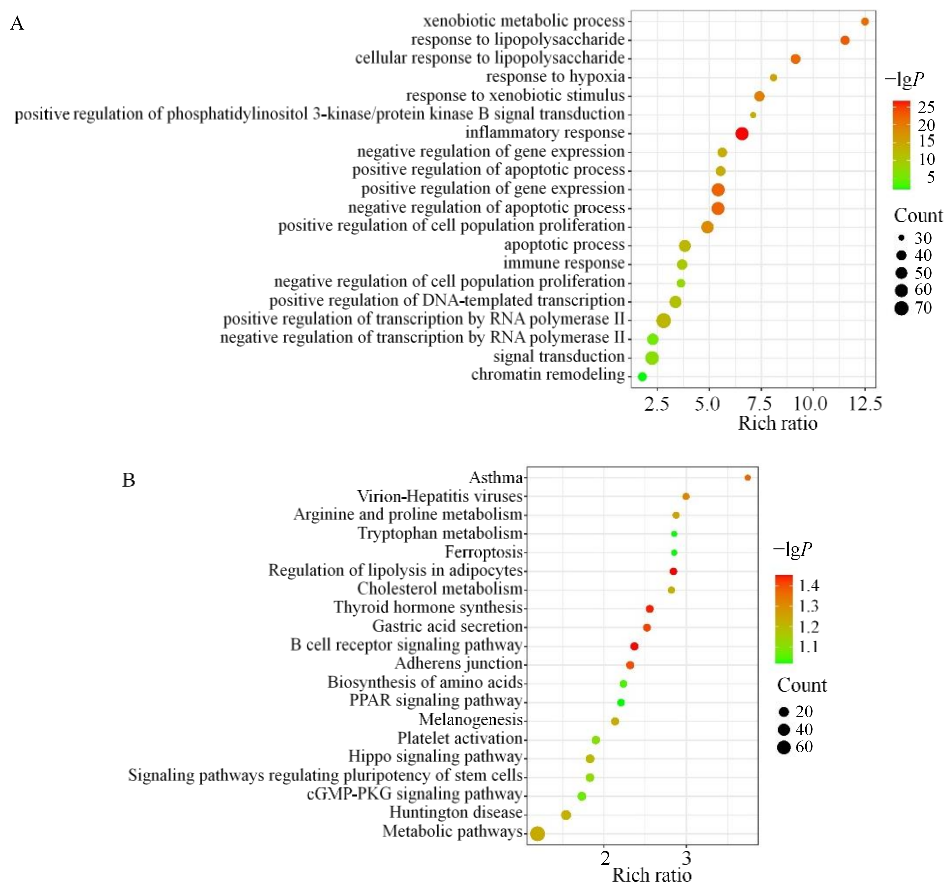


图 5 GO (A) 和 KEGG 通路分析 (B)

Fig. 5 GO (A) and KEGG pathways (B)

2.3.4 成分-靶点-通路构建 利用 Cytoscape 3.10.0 软件, 构建“成分-靶点-通路”网络, 见图 6。绿色三角形为大青叶肾毒性核心靶点, 黄色六边形为大青叶核心毒性成分, 紫色凹四边形的交集靶点所富集的排名前 20 的通路。

2.4 代谢组学与网络毒理学整合分析

代谢组学富集出 5 条代谢通路, 涉及 12 个潜在生物标志物, 通过 HMDB 数据库查找到 193 个靶点, 并与网络毒理学预测的 32 个毒性成分的 422 个靶点取交集, 得到 PTGS2、PTGS1、SRC、CYP2A6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2C9、CYP4A11、CYP2B6、CYP2C19、CYP3A5、CYP1B1、CYP2E1、CYP3A4、MIF、ALOX5、APRT、PLA2G2A、LPL、

ABCC1、AKR1B1、ACY1、ALB、CBS、GGT1、MTHFR、SLCO2B1 等 27 个共同作用靶点, 通过干预柠檬酸、花生四烯酸、白三烯 C4、吡哆醇等 4 种代谢物, 最终影响丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 花生四烯酸代谢, 氨基酸生物合成, 维生素 B₆ 代谢等 4 条通路。大青叶肾毒性可能由左旋樟脑、烟木二酮、正辛醛、(-)- α -蒎烯、靛蓝、十四烷等成分所致, “成分-靶点-代谢物-代谢通路”网络见图 7。

3 讨论

大青叶为我国传统常用清热解毒类中药材, 具有抗病毒、抗内毒素、抗炎、抗菌等多种作用^[16]。传统观念认为大青叶无毒性, 近年有研究发现大青叶具有一定毒性, 但毒性成分及机制尚不清楚^[17]。

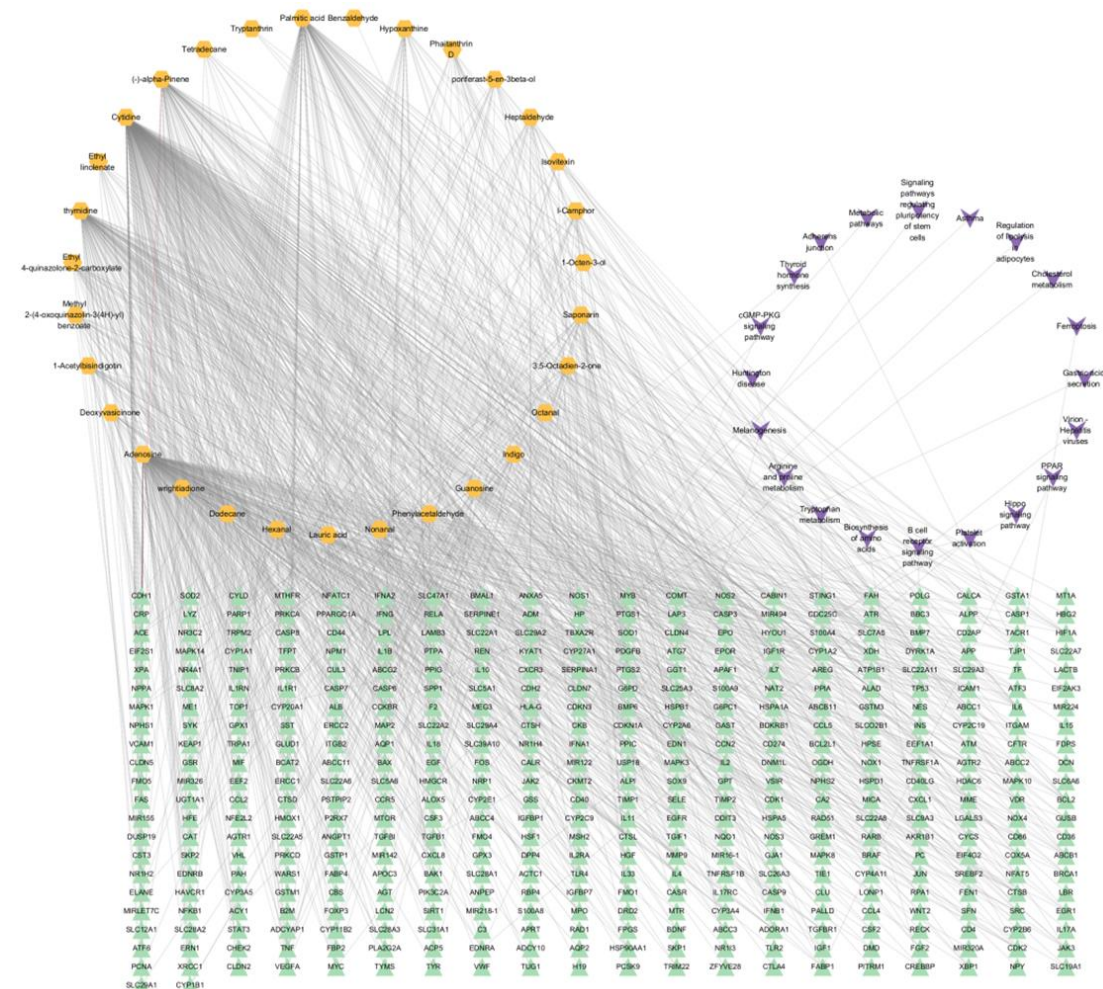


图 6 “成分-靶点-信号通路”网络

Fig. 6 “Component-target-signal pathway” network

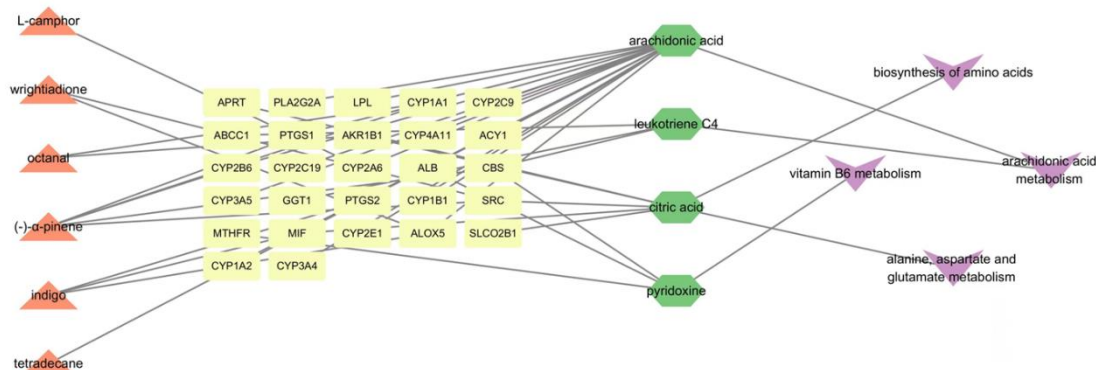


图 7 “成分-靶点-代谢物-代谢通路”网络

Fig. 7 “Component-target-metabolite-metabolic pathways” network

本研究利用血清代谢组学和网络毒理学方法初步阐明了大青叶肾毒性成分及机制，可为大青叶临床安全合理应用提供参考。

肾毒性生化指标检测结果显示，与对照组比较，大青叶低剂量组和高剂量组大鼠血清中的 KIM-1、Cys-C 水平明显升高；肾组织病理切片显示低剂量

组和高剂量组均出现了不同程度的损伤,表现为部分区域肾小管扩张、胞质空泡化、肾小球轻度萎缩。以上结果提示大青叶具有肾毒性。

为阐明大青叶肾毒性机制,采用代谢组学对对照组和大青叶提取物高剂量组大鼠血清样本进行分析。结果显示,ig 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ 大青叶提取物 90 d 后,大鼠体内代谢紊乱,并从血清中鉴定出 67 个潜在毒性生物标志物;对上述生物标志物进行通路富集分析,发现维生素 B₆ 代谢,丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢,氨基酸生物合成,精氨酸生物合成和花生四烯酸代谢等 5 种代谢途径可能与大青叶肾毒性相关。

本研究采用网络毒理学技术预测大青叶肾毒性成分及机制,共筛选出苯甲醛、色胺酮、烟木二酮等 32 种潜在毒性成分,涉及 IL6、TP53、TNF、IL1B、STAT3、EGFR、IL10、IFNG、BCL2、ALB 等 422 个肾毒性靶点,KEGG 富集得到 189 条相关信号通路,其毒性机制可能与哮喘、Virion-肝炎病毒、精氨酸和脯氨酸代谢、铁死亡、色氨酸代谢等密切相关。

在血清代谢组学和网络毒理学研究基础上,整合代谢物-靶点-代谢通路网络和成分-靶点-信号通路网络,构建成分-靶点-代谢物-代谢通路网络,深入阐述大青叶肾毒性成分及机制。结果显示,大青叶肾毒性可能与左旋樟脑、烟木二酮、正辛醛、(-)- α -蒎烯、靛蓝、十四烷等成分通过影响花生四烯酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,氨基酸的生物合成,维生素 B₆ 代谢等通路相关。

左旋樟脑已被证实为肾毒性成分,还具有肝毒性和胚胎毒性^[18];烟木二酮是一种同时含有异黄酮和茚酮结构的天然产物,已有研究证实其对结肠细胞具有一定的毒性^[19];正辛醛为刺激性和环境危害类物质,其可影响多种趋化因子和炎症因子的表达,并增加白细胞介素 6 (IL-6) 和 IL-8 的释放水平^[20];PubChem 数据库将(-)- α -蒎烯归属为刺激性物质,且有研究证实其具有潜在的呼吸系统和皮肤刺激^[21];PubChem 数据库将靛蓝归属为具健康危害类物质,且有研究证实其可通过抑制小鼠肾脏有机阴离子转运体而发挥肾毒性^[22];PubChem 数据库将十四烷归属为具健康危害类物质,另有研究证实其具有潜在的呼吸系统毒性^[23]。然而,上述 6 种成分与大青叶肾毒性的“量-时-毒”关系仍需进一步深入探究。

花生四烯酸代谢与大青叶肾毒性存在关联。当

机体受到有害刺激时,花生四烯酸经环氧合酶作用生成前列腺素 E₂,参与炎症反应^[24]。本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组差异代谢物前列腺素 E₂ 显著上调 ($P<0.01$),推测大青叶导致大鼠体内花生四烯酸代谢紊乱并引发炎症损伤。

肾脏通过氨基酸的合成与代谢维持机体氨基酸稳态^[25],因此,氨基酸合成和代谢紊乱可反映肾脏功能异常。瓜氨酸能够清除细胞中的羟基自由基,具有较强的抗氧化能力^[26]。本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组中瓜氨酸含量显著下降 ($P<0.05$),推测细胞受到氧化损伤。苯丙氨酸在苯丙氨酸羟化酶的作用下转化成酪氨酸,本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组苯丙氨酸水平显著上升 ($P<0.05$),推测大青叶可能抑制了苯丙氨酸羟化酶活性,阻断其转化为酪氨酸,这与文献^[27]报道的肾衰患者体内苯丙氨酸羟化酶活性会被抑制一致。*L*-胱硫醚为含硫氨基酸的代谢中间体,其可在胱硫醚 γ -裂解酶的作用下分解为半胱氨酸和 α -酮丁酸^[28]。已有研究表明,肾功能不全患者血浆中 *L*-胱硫醚水平显著上升^[29],本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组 *L*-胱硫醚水平显著上升 ($P<0.01$),推测大青叶可能通过抑制胱硫醚 γ -裂解酶活性导致 *L*-胱硫醚水平上升。苯乙酰谷氨酰胺是肠道微生物产生的活性代谢产物^[30],而在慢性肾脏疾病患者中易观察到高水平的苯乙酰谷氨酰胺^[31],本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组苯乙酰谷氨酰胺水平显著上升 ($P<0.05$),推测可能是大青叶降低了肾小球的滤过率所致。

维生素 B₆ 是一类易于转化的 2-甲基-3-羟基吡啶类化合物的总称,包含吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺等 6 种形式,可参与机体氨基酸、脂质代谢和抗氧化、抗炎反应^[32-33]。4-吡哆酸是维生素 B₆ 在体内的终极代谢产物,血浆中高浓度 4-吡哆酸可诱导炎症反应、上调炎症因子的表达^[34],本实验中,与对照组比较,大青叶提取物高剂量组 4-吡哆酸水平显著上升 ($P<0.01$),推测可能与大青叶所致肾脏炎症反应相关。

综上,本研究基于血清代谢组学和网络毒理学,初步确定大青叶肾毒性可能是左旋樟脑、烟木二酮、正辛醛、(-)- α -蒎烯、靛蓝、十四烷等 6 种成分通过干扰花生四烯酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,氨基酸的生物合成,维生素 B₆ 代谢等 4 条通路所致。下一步课题组将对上述毒性成分、

代谢通路等进行体内外验证,深入研究大青叶的肾毒性及机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang B, Xie Y, Guo M J, et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13(10): 1605-1611.
- [2] 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.
Guo X, Wang M, Zhu Y, et al. Research status of nephrotoxicity mechanism of Chinese materia medica and progress in study on evaluation methods [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(23): 3581-3591.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [4] 李园园, 方建国, 王文清, 等. 大青叶历史考证及现代研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1750-1753.
Li Y Y, Fang J G, Wang W Q, et al. Historical textual research and modern research progress of *Folium Isatidis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2005, 36(11): 1750-1753.
- [5] Blowey D L. Nephrotoxicity of over-the-counter analgesics, natural medicines, and illicit drugs [J]. Adolesc Med Clin, 2005, 16(1): 31-43, x.
- [6] 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.
Feng X, Fang S N, Gao Y X, et al. Current research situation of nephrotoxicity of Chinese herbal medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(3): 417-424.
- [7] 黄可儿, 李小兵. 具有肾毒性的中药的药性分析 [J]. 中药新药与临床药理, 1996, 7(3): 48-49.
Huang K E, Li X B. Analysis of properties of traditional Chinese medicine with nephrotoxicity [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 1996, 7(3): 48-49.
- [8] 湖北省武钢大冶铁矿职工医院. 大青叶注射液引起血尿一例报告 [J]. 新医学, 1972, 3(7): 33-34.
Daye Iron Mine Workers' Hospital, Hubei Province. A case report of hematuria caused by *Isatidis Folium* injection [J]. J New Med, 1972, 3(7): 33-34.
- [9] 陈乐, 汪喻巧, 朱芸芸, 等. 整合代谢组学和网络药理学探究蕲艾的安全性及毒理学机制 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3331-3344.
Chen L, Wang Y Q, Zhu Y Y, et al. Safety and toxicological mechanism of *Artemisia argyi* based on integrated metabolomics and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(10): 3331-3344.
- [10] 刘睿, 李新宇, 李亚卓, 等. 网络毒理学及其在中药毒性成分预测中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 709-715.
Liu R, Li X Y, Li Y Z, et al. Network toxicology and its application in predicting the toxicity of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(5): 709-715.
- [11] 孙文学, 盛云华, 黄坚, 等. 商陆长期毒性及毒代动力学研究 [J]. 中国现代应用药理学, 2023, 40(2): 145-153.
Sun W X, Sheng Y H, Huang J, et al. Study on long-term toxicity and toxicokinetics of *Phytolacca Radix* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(2): 145-153.
- [12] 李一飞, 徐婷婷, 姚广涛, 等. 尿液 NGAL, KIM-1, IL-18 在商陆所致的大鼠肾损伤中的变化特征及其联合检测的意义 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3611-3617.
Li Y F, Xu T T, Yao G T, et al. Characteristics of changes in urinary NGAL, KIM-1 and IL-18 in *Phytolacca Radix*-induced renal injury in rats and significance of combined detection [J]. China J Chin Mater Med, 2012, 37(23): 3611-3617.
- [13] Chen J, Zhu Z P, Gao T H, et al. *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium*: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114648.
- [14] Wong L W, Goh C B S, Tan J B L. A systemic review for ethnopharmacological studies on *Isatis indigotica* fortune: Bioactive compounds and their therapeutic insights [J]. Am J Chin Med, 2022, 50(1): 161-207.
- [15] Chen Q, Lan H Y, Peng W, et al. *Isatis indigotica*: A review of phytochemistry, pharmacological activities and clinical applications [J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(9): 1137-1150.
- [16] 杨立国, 王琪, 苏都那布其, 等. 菰蓝属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2021, 38(16): 2039-2048.
Yang L G, Wang Q, Su D, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Isatis* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(16): 2039-2048.
- [17] 宋立人. 现代中药学大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
Song L R. Dictionary of Modern Chinese Medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [18] Dosoky N S, Setzer W N. Maternal reproductive toxicity of some essential oils and their constituents [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2380.
- [19] De Los Reyes M M, Oyong G G, S Ng V A, et al. Cytotoxic compounds from *Wrightia pubescens* (R.Br.) [J]. Pharmacognosy Res, 2018, 10(1): 9-15.
- [20] Song M K, Lee H S, Choi H S, et al. Octanal-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity:

- Expression and release of cytokines in A549 human alveolar cells [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(7): 710-721.
- [21] Program N T. Toxicity studies of α -pinene administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1/N mice [J]. *Toxic Rep Ser*, 2016(81): NTP-TOX-81.
- [22] 奇锦峰, 孙晨, 王永辉, 等. 板蓝根及所含靛蓝和靛玉红强烈抑制小鼠肾主要有机阴离子转运体 Oat1, Oat2 和 Oat3 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(6): 878-886.
- Ji J F, SUN C, WANG Y H, et al. Inhibition of Radix Isatidis and its constituents indigo and indirubin on major organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in mouse kidneys [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2014, 28(6): 878-886.
- [23] Zhang Z, Kleinstreuer C. Deposition of naphthalene and tetradecane vapors in models of the human respiratory system [J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(1): 44-57.
- [24] 薛瑞, 苗一非, 杨吉春, 等. 前列腺素 E2 对免疫细胞及炎症相关疾病的调控作用 [J]. *生理科学进展*, 2011, 42(3): 165-168.
- Xue R, Miao Y F, Yang J C, et al. Prostaglandin(PG) E2 in regulation of immunity and inflammatory diseases [J]. *Prog Physiol Sci*, 2011, 42(3): 165-168.
- [25] Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, et al. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease [J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(4): 424-433.
- [26] Sureda A, Cordova A, Ferrer M D, et al. Effects of L-citrulline oral supplementation on polymorphonuclear neutrophils oxidative burst and nitric oxide production after exercise [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(9): 828-835.
- [27] Stonier C, McGale E H, Aber G M. Studies of phenylalanine hydroxylase activity in patients with chronic renal failure: The effect of haemodialysis [J]. *Clin Chim Acta*, 1984, 143(2): 115-122.
- [28] Finkelstein J D, Martin J J. Homocysteine [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(4): 385-389.
- [29] Herrmann W, Schorr H, Obeid R, et al. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(5): 891-897.
- [30] 关帅埔, 姜文华, 穆楠. 肠道微生物代谢产物苯乙酰谷氨酰胺在心血管疾病中的研究进展 [J]. *山西医科大学学报*, 2024, 55(3): 399-404.
- Guan S P, Jiang W H, Mu N. Research progress of phenylglutamine, a metabolite of intestinal microbiota, in cardiovascular diseases [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2024, 55(3): 399-404.
- [31] Fryc J, Naumnik B. Thrombolome and its emerging role in chronic kidney diseases [J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(3): 223.
- [32] 周楚然, 王美玲, 黄建忠, 等. 维生素 B₆ 的生理活性与合成的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2024, 44(4): 88-101.
- Zhou C R, Wang M L, Huang J Z, et al. Advances in physiological activities and synthesis of vitamin B₆ [J]. *China Biotechnol*, 2024, 44(4): 88-101.
- [33] Chiang E P, Smith D E, Selhub J, et al. Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6 [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): R1254-R1262.
- [34] 李一平. 冠心病发病机制的代谢组学初步探索及优化冠心病介入治疗的临床研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- Li Y P. Preliminary metabonomics exploration on the pathogenesis of coronary heart disease and clinical study on optimizing interventional therapy of coronary heart disease [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2017.

[责任编辑 齐静雯]