

CCl₄致大鼠慢性肝损伤模型参数优化及代谢组学评价

范慧君^{1,2}, 邢 婕^{1*}, 孙慧敏³, 田俊生¹, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学 化工学院, 山西 太原 030006

3. 万柏林区卫生和计划生育局, 山西 太原 030006

摘要: 目的 研究CCl₄致大鼠慢性肝损伤模型的最佳造模剂量和时间, 并进行代谢组学评价。方法 SPF级雄性SD大鼠随机分为6组, 即对照组和10%、20%、30%、40%、50% CCl₄组。CCl₄组sc给予不同浓度的CCl₄大豆油溶液, 注射体积为2 mL/kg, 每周2次, 连续8周, 对照组给予等体积溶剂油。大鼠于造模0、2、4、6、8周末置代谢笼12 h收集尿液, 取出后采用眼球后静脉丛穿刺法取静脉血0.3 mL, 常规分离血清; 4、6周末各处死3只大鼠, 取肝脏; 8周末造模后处死大鼠, 分离各脏器, 称质量计算脏器系数。观察动物体质量、肝脏外观和病理切片、全自动生化仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)。对10% CCl₄组尿液进行氢核磁共振(¹H-NMR)代谢组学测定, 运用SPSS、MatLab7.5、SIMCA-P软件对数据进行分析。结果 对照组大鼠体质量保持增长; 随着CCl₄剂量增高, 各模型组大鼠体质量增长速度渐趋缓慢。造模8周后, 与对照组比较, 10% CCl₄组肝脏系数显著升高($P<0.01$), 其他组肝脏系数无显著性变化; 20%~50% CCl₄组的脾脏、肾脏系数, 20%、40%、50% CCl₄组的肺脏系数均显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。造模4周后, 10% CCl₄组大鼠肝脏出现了慢性炎症表现, 而20%~50% CCl₄组大鼠肝脏损伤明显, 出现明显坏死现象; 6周后, 造模组大鼠肝脏均出现肝硬化病变。造模组大鼠血清ALT和AST与对照组比较均显著升高($P<0.05$ 、 0.01), 且均出现了先升高后降低趋势。代谢组学研究结果显示, 造模4周起大鼠尿液与0周可以显著分离。共寻找到差异代谢物15个, 6条重要的代谢通路, 涉及能量代谢、脂质代谢、氨基酸和核苷酸代谢等途径。结论 慢性肝损伤模型造模剂量以10% CCl₄、2 mL/kg为宜, 造模时间以4~6周为宜, 代谢组学研究可以动态追踪造模过程。

关键词: 慢性肝损伤; CCl₄; 代谢组学; 氢核磁共振(¹H-NMR); 参数

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)03-0412-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.006

Parameter optimization and metabolomics study of CCl₄-induced chronic liver injury model

FAN Huijun^{1,2}, XING Jie¹, SUN Huimin³, TIAN Junsheng¹, QIN Xuemei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Health and Family Planning Bureau of Wanbolin district, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To explore the optimal dose and time of modeling for chronic liver injury induced by CCl₄ in rats, and to evaluate its metabolomics. **Methods** SPF male Sprague Dawley rats were randomly divided into six groups: control group, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% CCl₄ group. Rats in CCl₄ group were sc injected with CCl₄ soybean oil solution of different concentrations, the volume of injection was 2 mL/kg, twice a week for 8 weeks. Rats in control group were given the same volume of solvent oil. At the end of 0, 2, 4, 6, and 8 weeks of modeling, rats were placed in metabolic cages to collect urine for 12 h. After removal, 0.3 mL of venous blood was collected by retrobulbar venous plexus puncture, and serum was separated routinely. At the end of 4 and 6 weeks, three rats were executed to isolate the livers. At the end of 8 weeks, the organs of rats were separated, and the

收稿日期: 2018-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770362); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室(201605D111004)。

第一作者: 范慧君(1990—), 女, 在读研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (0351)7011501 E-mail: pinkfanhuijun@163.com

*通信作者: 秦雪梅, 教授, 研究方向为中药质量控制与活性成分、中医药代谢组学。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

邢 婕, 讲师, 主要研究方向为中药质量控制。Tel: 13453420249 E-mail: xingjie@sxu.edu.cn

organ coefficient was calculated by weighting. Animal weight, organ coefficient, liver pathological changes, serum alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were observed. The urine of rats in 10% CCl₄ group were determined by using ¹H-NMR metabolomics. The data were analyzed using SPSS, MatLab7.5, and SIMCA-P softwares. **Results** The body mass of rats in the control group kept increasing; With the increase of CCl₄ dosage, the growth rate of body mass of rats in each model group gradually slowed down. After 8 weeks, compared with the control group, the liver coefficient of 10% CCl₄ group was increased significantly ($P < 0.01$), while that of other groups did not change significantly; The spleen and kidney coefficients of 20%—50% CCl₄ group and lung coefficients of 20%, 40% and 50% CCl₄ group were increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). Four weeks after modeling, rats in the 10% CCl₄ group showed chronic liver inflammation, while 20% to 50% CCl₄ group rats showed obvious liver injury and necrosis. Six weeks later, the liver of the model group rats showed cirrhosis. The ALT and AST enzymes in the serum of rats in modeling group were significantly increased compared with control group ($P < 0.05, 0.01$), in the trend of first increased then decreased. Metabolomics studies showed that the urine of rats can be significantly separated from that of 0 week after fourth week of modeling. A total of 15 differential metabolites and six important metabolic pathways were found by urine ¹H-NMR metabolomics techniques, including energy metabolism, lipid metabolism, amino acid and nucleotide metabolism. **Conclusion** The optimal dose of chronic liver injury model is 0.02 mL CCl₄/100 g, and the optimal modeling time is 4—6 weeks. The metabolomics study can track the dynamic process of modeling.

Key words: chronic liver injury; CCl₄; metabolomics; ¹H-NMR; parameter

肝脏承担人体新陈代谢,被称为人体的“化工厂”,极易受到外来化学因素的攻击和干扰,肝脏疾病成为临床常见病之一。化学毒物诱导实验性肝损伤动物模型,是研究肝病发病机制、评价药物疗效和肝毒性的重要手段之一,其中CCl₄是最为经典的造模毒物,依据造模时长分急性和慢性模型,但文献报道CCl₄在造模参数上跨度比较大。近年来相关的学位论文中^[1-3],选择的大鼠品系主要是SD大鼠,造模方式也以sc为主,但造模时长最短4周,最长可达12周,CCl₄实际造模剂量也从(0.05~0.20) mL/100 g不等。这给实验工作人员造成了较大困惑,而一旦模型失败会直接造成研究工作失败,导致大量时间和人力的浪费。

针对这种现象,国内有一些学者对CCl₄致大鼠慢性肝损伤造模过程进行了研究,主要观察指标为血清生化和组织病理学指标^[4-5],对该模型更加全面的评价信息还未见研究。本文采用不同剂量CCl₄sc给药方式,详细观察动物体质量、脏器系数、肝组织外观、肝脏病理切片、血清生化检测等指标,同时采用尿液氢核磁共振(¹H-NMR)代谢组学方法对造模过程进行动态追踪。从大鼠尿液代谢轮廓的偏离情况观察模型动物变化过程,旨在探索CCl₄致大鼠慢性肝损伤的最佳造模剂量和时长,以期对模型复制和肝脏疾病的研究提供基础。

1 材料

1.1 主要试剂

金龙鱼大豆调和油(益海嘉里食品营销有限公司);CCl₄(分析纯,北京化工厂,批号20120124);三

甲基硅烷丙酸钠盐(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA);NMR试剂重水(德国Norell公司)。实验用水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器

Sartorius BSA124S分析天平(德国Sartorius公司);代谢笼(苏州实验动物笼具厂);PRIME60i全自动生化分析仪(Thermo Fisher);Bruker 600-MHz AVANCE III核磁共振检测仪(德国布鲁克公司)。

1.3 实验动物

SPF级雄性Sprague Dawley大鼠84只,购自军事科学院动物研究中心,实验动物生产许可证号为SCXK2012-0006,清洁级,体质量为(180±20)g,在22~23℃、40%~70%温湿度条件下适应饲养7 d,12 h昼夜交替,自由饮水饮食。

2 方法

2.1 动物分组与处理和样品收集

大鼠随机分为6组,每组14只,即对照组和10%、20%、30%、40%、50% CCl₄组。CCl₄组sc给予不同浓度的CCl₄大豆油溶液,注射体积为2 mL/kg,每周2次,连续8周,对照组给予等体积溶剂油。大鼠于造模0、2、4、6、8周末置代谢笼12 h,期间禁食、自由饮水。收集尿液,记录体积,取10 mL置于EP管中,于-80℃冰箱保存,其余弃去。大鼠从代谢笼取出后采用眼球后静脉丛穿刺法取静脉血0.3 mL,常规分离血清,于-80℃冰箱保存,用于生化指标测定。

4、6周末各处死3只大鼠,取肝脏左叶用体积分

数为10%的甲醛水溶液固定,观察肝脏组织病理学变化。8周末大鼠造模后先置于代谢笼收集尿液,取出后20%乌拉坦ip麻醉,股动脉取血,之后迅速解剖,分离各脏器称质量计算脏器系数,肝脏和血液处理同6周末。

2.2 大鼠肝组织病理切片观察

大鼠肝脏自体内取出后立刻浸入10%甲醛水溶液中固定至少48 h。取出经水冲洗固定液,酒精梯度脱水后石蜡包埋。组织包埋后经5 μm 切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片,HE染色。树胶封片,镜检。

2.3 大鼠血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)测定

血清样品从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出置于冰水混合溶液中解冻。采用全自动生化分析仪测定血清AST、ALT。

2.4 代谢组学样品制备及测定

2.4.1 样品制备 尿液样本参照本实验室方法^[6]制备 ^1H -NMR供试品溶液,冰水混合溶液解冻尿液样品,取尿液500 μL 于EP管中,加入PBS溶液50 μL ,加入10%的重水进行锁场和0.03%的TSP作为化学位移参照,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min离心20 min,取上清液500 μL 于内径5 mm的核磁管中。

2.4.2 测定方法 样本在Bruker 600 MHz AVANCE III核磁共振仪上采集数据,采用noesyppr1d脉冲序列。扫描次数:64次;采集时间:5 min,光谱宽度12 345.7 Hz,光谱大小65 536点,脉冲宽度(PW)12.7 μs ,松弛延迟(RD)1.0 s。

2.4.3 谱图处理 采用MestReNova核磁图谱专业处理软件(version 10.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain)对所有 ^1H -NMR图谱进行傅里叶转换,相位、基线调整采取手动方式。以TSP定标,对谱图进行化学位移的校正;以 δ 0.04为单位,对 δ 0.60~9.00区域的谱图进行等宽度分割,切除 δ 4.70~5.20和 δ 5.58~6.10区域以消除水峰和尿素峰影响,对图谱进行分段积分;将所产生的积分数据以峰面积/总峰面积进行归一化后导入Excel软件保存。

采用SIMCA-P 14.0软件(Umetrics,瑞典),将 ^1H -NMR采集处理的积分数据进行均值中心化和Par规格化后,进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

2.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0软件进行数

据处理,采用One-way ANOVA对体质量、脏器系数及生化指标进行统计学分析;对差异代谢物采用独立样本 t 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 动物异常死亡情况与体质量观察

动物异常死亡情况:造模第6周,30%、50% CCl_4 组大鼠各死亡1只。立即解剖后发现死亡动物小肠颜色黑青;腹腔内有腹水且有组织黏连情况;肝脏色白,且体积缩小,其他脏器正常;血液颜色较浅,离心后血清量约占全血总量的4/5。

造模第7周,30% CCl_4 组大鼠死亡3只,解剖情况同上。在4周末和6周末各处死3只大鼠,30% CCl_4 组第7周后仅剩4只大鼠。这可能也是图1中30% CCl_4 组大鼠后期体质量均值出现异常(不降反升)的原因。

造模第8周,40% CCl_4 组大鼠死亡3只,立即解剖发现其肝脏外观颜色呈浅粉色,表面凹凸不平,有颗粒状附着;肾脏呈灰绿色,脾脏明显变粗,质地变脆变硬;腹腔内大量腹水,血液情况同造模6周死亡大鼠。50% CCl_4 组大鼠死亡1只,解剖发现其腹腔内呈白色弥漫状,已无腹水。

30%~50% CCl_4 组大鼠从第6周开始出现了异常死亡情况,说明30%以上的 CCl_4 剂量、造模超过6周时,对大鼠已造成全身毒性,动物极易出现死亡,药物此时已很难发挥逆转疗效。

每次造模前称量大鼠体质量,结果如图1所示,对照组动物体质量一直保持增长;随着 CCl_4 剂量增高,各模型组大鼠体质量虽有增长,但增长速度随剂量增大而渐趋缓慢。

图1 各组大鼠体质量变化

Fig. 1 Changes in body weights in different groups

3.2 脏器系数结果

造模8周后,与对照组比较,10% CCl_4 组肝脏脏器系数显著升高($P < 0.01$),其他组肝脏脏器系数无

显著性变化。结合血清转氨酶测定结果分析,可能是8周时,20%~50% CCl₄组肝脏已处于失代偿期,肝脏体积缩小所致^[7]。与对照组比较,20%~50% CCl₄组的脾脏、肾脏系数,20%、40%、50% CCl₄组的肺脏系数均显著升高($P<0.05, 0.01$)。提示20%以上的CCl₄造模剂量可能过大,引起大鼠多脏器损伤。结果见表1。

3.3 肝组织外观

对照组肝脏在整个实验过程中颜色均呈暗红色,表面光滑,质地柔软。造模组肝脏随时间延长及剂量增加颜色逐渐变浅,最终呈灰黄色;体积逐渐增大;肝脏表面逐渐粗糙,呈颗粒状改变,凹凸不平,质地变韧。提示随染毒时间及剂量逐渐增加,肝脏病变逐渐加重。

3.4 肝组织病理学观察

如图2所示,对照组肝脏组织在整个实验过程中肝小叶结构清晰,肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列,肝窦结构规整,肝细胞核呈圆形,胞质

红染,肝汇管区无炎性细胞浸润。造模组肝脏组织均出现不同程度病变。

造模4周后,10% CCl₄组大鼠肝脏出现了慢性炎症表现,而20%~50% CCl₄组大鼠肝脏损伤明显,已经出现明显坏死现象。

造模6周后,10% CCl₄组肝细胞肿胀、中度变性、坏死及纤维细胞增生。而20%~50% CCl₄组均出现肝细胞肿胀、重度变性、坏死及纤维细胞与胆管细胞增生。

模型8周后,各造模组肝纤维组织增生明显,将肝小叶分割为大小不等的假小叶,假小叶内中央静脉出现缺失或移位。肝细胞坏死,肝细胞脂肪变性,浆内可见大小不等的圆形空泡,有炎性细胞浸润。

3.5 大鼠血清ALT、AST测定结果

如表2、3所示,从造模2周开始,所有模型组大鼠血清ALT和AST与对照组比较均显著上升($P<0.05, 0.01$),且均出现了先升高后降低趋势。原因

表1 造模8周末各组大鼠脏器系数(±s)

Table 1 Organic index of rats in different groups at 8th week after modeling (±s)

组别	n/只	脏器系数/(g·g ⁻¹)			
		肝	脾	肾	肺
对照	8	0.02949±0.00190	0.00147±0.00016	0.00571±0.00035	0.00331±0.00054
10% CCl ₄	8	0.03804±0.00927**	0.00157±0.00042	0.00612±0.00142	0.00377±0.00115
20% CCl ₄	8	0.03420±0.00617	0.00246±0.00067*	0.00682±0.00102*	0.00404±0.00036*
30% CCl ₄	4	0.03855±0.01145	0.00277±0.00082*	0.00720±0.00096*	0.00416±0.00096
40% CCl ₄	5	0.03324±0.00840	0.00361±0.00090*	0.00715±0.00045**	0.00437±0.00049**
50% CCl ₄	6	0.02955±0.00849	0.00276±0.00076*	0.00745±0.00075**	0.00456±0.00077**

与对照组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

图2 大鼠肝组织病理切片图(×100)

Fig. 2 Sections showing histopathological changes in rats liver tissue (×100)

表2 大鼠血清ALT测定结果($\pm s$)
Table 2 Activity of ALT in serum of rats ($\pm s$)

组别	ALT/(U·mL ⁻¹)			
	造模2周	造模4周	造模6周	造模8周
对照	69.1±11.1	60.7±6.5	46.16.2	46.4±9.2
10% CCl ₄	100.8±35.2**	829.6±301.3**	1 142.6±659.3**	790.8±597.8**
20% CCl ₄	1 011.1±695.0**	1 639.5±833.7**	1 674.2±879.8**	740.1±535.5**
30% CCl ₄	665.4±16.1**	1 688.1±1077.9**	1 071.0±796.3**	569.0±198.9**
40% CCl ₄	1 158.8±732.1**	1 803.9±873.9**	969.6±409.3**	321.0±144.9**
50% CCl ₄	551.6±363.8**	1 556.2±907.7**	1 206.9±727.0**	476.5±196.9**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表3 大鼠血清AST测定结果($\pm s$)
Table 3 Activity of AST in serum of rats ($\pm s$)

组别	AST/(U·mL ⁻¹)			
	造模2周	造模4周	造模6周	造模8周
对照	122.4±17.6	122.1±22.5	134.8±43.2	148.9±14.6
10% CCl ₄	182.7±18.0**	652.2±222.6**	825.2±512.7**	702.3±571.4*
20% CCl ₄	1 073.4±31.5**	1 481.2±1029.3**	1 863.7±984.5**	1 050.0±581.5**
30% CCl ₄	767.2±38.8**	1 262.3±1269.6**	1 533.5±1199.3**	844.3±353.8*
40% CCl ₄	1 277.0±847.7**	1 816.5±1351.7**	1 790.7±656.7**	756.0±467.6*
50% CCl ₄	589.7±303.1**	1 415.9±946.7**	1 609.8±901.6**	852.8±383.8**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

可能是,前期CCl₄使大鼠肝细胞膜受到破坏^[8],细胞内酶流失,使血清中检测到的酶含量急剧升高。但4~6周以后,大鼠肝脏已处于慢性肝损伤向肝硬化转变过程中,肝脏已处于失代偿期,肝脏转氨酶不升反降^[9]。从转氨酶结果看,4~6周是比较合适的造模时间。

3.6 尿液代谢组学

综合大鼠肝脏外观、肝组织病理学观察、血清转氨酶测定结果,CCl₄致大鼠慢性肝损伤造模剂量以10% CCl₄、2 mL/kg为宜。故后续¹H-NMR代谢组学研究仅选择10% CCl₄组大鼠尿液样品进行分析。

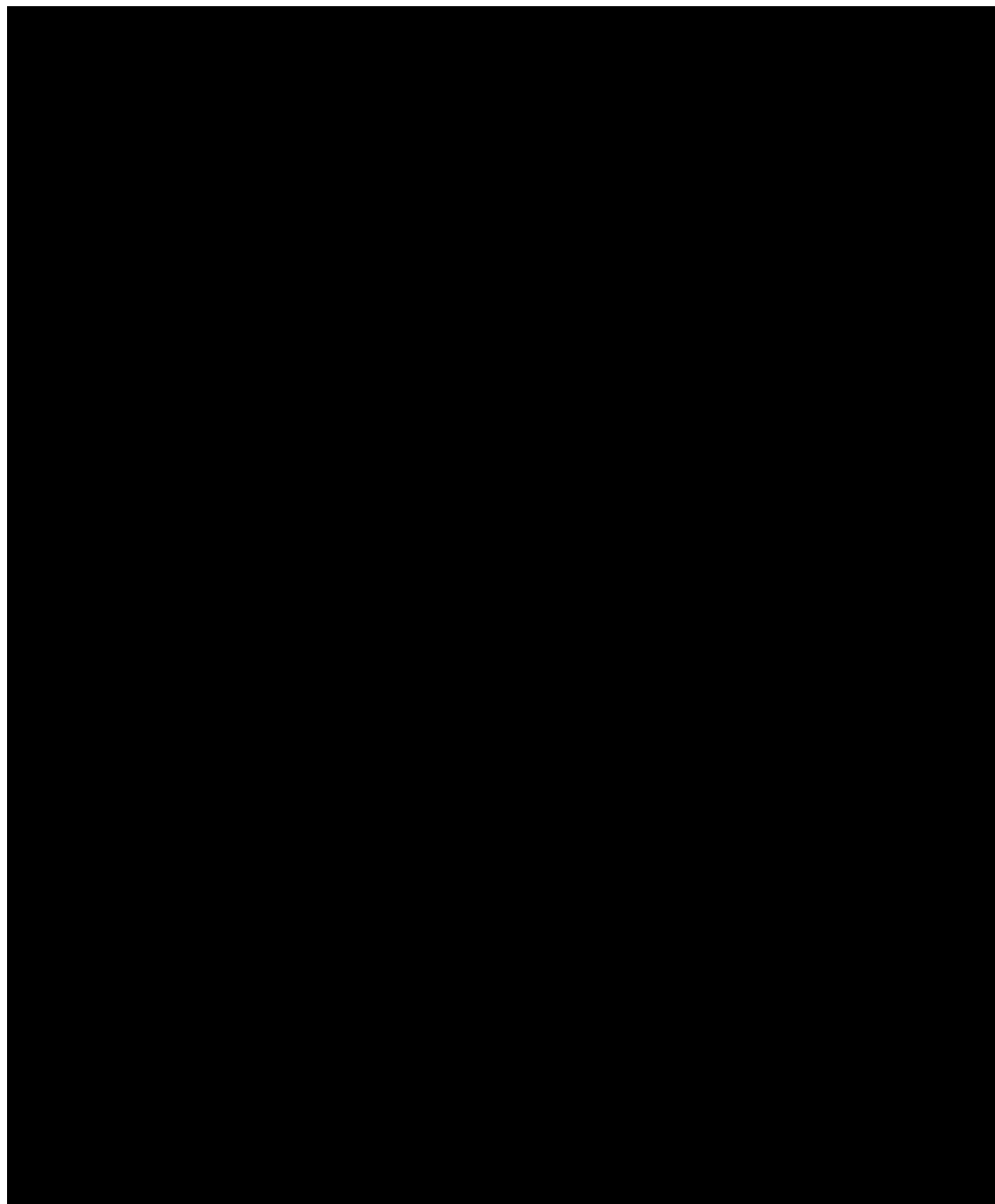
3.6.1 ¹H-NMR图谱指认 通过对化学位移、峰形的分析,结合 Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) (<http://www.bmrb.wisc.edu>)数据库和参考文献^[10-11],从大鼠尿液¹H-NMR图谱中指认出24种代谢物。见图3、表4。

3.6.2 不同时间点10% CCl₄组大鼠尿液¹H-NMR动态 选取10% CCl₄组大鼠,采用多元统计分析方法,比较造模0周末与2、4、6、8周末4个时间点尿液

动态变化。由PLS-DA得分散点图(图4)可见,随着造模时间增加,10% CCl₄组大鼠尿液轮廓逐渐远离初始时间点,随着时间的延长,CCl₄造成了大鼠体内代谢轮廓越来越偏离正常。

为了更加直观观察不同时间点10% CCl₄组大鼠尿液与初始时间点的偏离趋势,继续采用PLS-DA分析方法,分别比较0周末与2、4、6、8周末4个时间点的分离情况(图5)。由图5A可见,0周末和2周末的大鼠尿液已经具有分离趋势,但模型验证(图5E)显示模型无效。4、6、8周末的大鼠尿液与0周可以显著分离(图5B、C、D),且模型验证也可通过(图5F、G、H)。提示从4周末开始,大鼠体内的代谢产物轮廓所发生的变化已经显著反映在尿液中。

3.6.3 差异代谢物的寻找和分析 根据VIP值和S-Plot图,以及代谢物相对定量寻找不同时间点10% CCl₄组大鼠尿液和初始时间点分离的差异代谢物。为了量化不同时间点尿液中差异代谢物的偏离程度,引入了“偏离指数”^[12](Deviation Index, DI)这一

图3 大鼠尿液¹H-NMR图谱Fig. 3 Representative ¹H-NMR spectra of rats' urine

概念,DI数值越大,表明其偏离正常值的程度越大。

$$DI = \sum_{i=1}^n \frac{|C_i - C_0|}{C_0}$$

C_i 表示不同时间点代谢物的相对含量; C_0 表示相应代谢物在初始时间点(造模0周)时的相对含量。

从表5中可见,在寻找到的15个差异代谢物中,造模4周末时,脂质、异亮氨酸、3-羟基丁酸、丙氨酸、琥珀酸、苯丙氨酸6个代谢物偏离了正常水平;6周末时,脂质、3-羟基丁酸、琥珀酸、乳酸、柠檬

酸、卵磷脂、牛磺酸、 β -葡萄糖、肌酸等9个代谢物偏离了正常水平;8周末时,脂质、3-羟基丁酸、丙氨酸、琥珀酸、苯丙氨酸、肌酸、氧化三甲胺、甜菜碱、尿嘧啶9个代谢物偏离了正常水平。随着时间延长,发生偏离的差异代谢物数量不断增多;相同的差异代谢物,随着时间延长,偏离程度越来越大,4、6和8周末DI分别为455.0、766.2和1 081.9。

3.6.4 代谢通路分析 采用¹H-NMR分析手段检测出24种代谢物,从中筛选出15种差异代谢物。将

表4 大鼠尿液¹H-NMR图谱指认表
Table 4 Assignments of ¹H-NMR spectra obtained from rats' urine

编号	代谢物	化学位移
1	脂质	0.89(m), 1.27(m)
2	泛酸	0.90(s), 0.94(s), 3.96(s)
3	异亮氨酸	0.96(t), 1.06(d)
4	缬氨酸	0.99(d), 1.04(d)
5	3-羟基丁酸	1.20(d), 2.31(dd)
6	乳酸	1.33(d), 4.12(q)
7	丙氨酸	1.48(d)
8	乙酸	1.92(s)
9	琥珀酸	2.41(s)
10	2-酮戊二酸	2.45(t), 3.03(t)
11	柠檬酸	2.53(d), 2.68(d)
12	二甲胺	2.72(s)
13	三甲胺	2.88(s)
14	二甲基甘氨酸	2.92(s)
15	肌酸	3.04(s), 3.93(s)
16	磷脂酰胆碱	3.22(s)
17	氧化三甲胺	3.27(s)
18	牛磺酸	3.27(t), 3.43(t)
19	甜菜碱	3.27(s), 3.90(s)
20	鲨肌醇	3.36(s)
21	β-葡萄糖	3.90(dd)
22	富马酸	6.53(s)
23	苯丙氨酸	7.32(m), 7.42(m)
24	尿嘧啶	7.55(d)

图4 10% CCl₄组大鼠不同时间点尿液多元统计分析图
Fig. 4 Multivariate statistical analysis of rats' urine at different time

这些代谢物输入 MetaboAnalyst 中进行通路富集分析,结果见图6。富集概况图(图6B)中,富集倍数越大说明参与此条通路的代谢物越多,*P*值越大(颜色越深),表示参与其中代谢物或代谢通路发生的变

化越明显^[13]。MetPA 通路分析结果(图6A)与代谢产物富集结果一致,每个圆的颜色和大小是基于*P*值和通路影响因子决定的,即节点颜色越深参与此通路的代谢物越多,节点越大则它在此次机体的整体代谢轮廓中占的比例越大,作用越明显^[14]。其中 MetPA 共给出 18 条通路分析的结果,结合 Holm *P* 值、FDR (false discovery rate) 和 Impact 值共发现 6 条重要的代谢通路:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,牛磺酸和亚牛磺酸代谢,苯丙氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,乙醛酸和二羧酸代谢,以及三羧酸(TCA)循环,参与 CCl₄ 诱导慢性肝损伤过程中的代谢变化。

4 讨论

针对文献中存在的 CCl₄ 致大鼠慢性肝损伤造模剂量和时间跨度大的问题,本研究采用 10%~50%(0.02 mL CCl₄/100 g~0.1 mL CCl₄/100 g) 5 个造模剂量,通过观察大鼠体质量、脏器系数、肝脏外观和病理切片、血清转氨酶,结合大鼠异常死亡情况,确定了该模型的造模剂量以 10% 即 0.02 mL CCl₄/100 g 为宜,造模时间以 4~6 周为宜。尿液代谢组学动态追踪结果也印证了到 4 周末时,大鼠尿液代谢轮廓已明显偏离正常状态。实验剂量的确定主要是通过前期查阅文献^[15-18],CCl₄ 致慢性肝损伤的造模剂量一般采用 10%~50% CCl₄,故本实验中采用的剂量为 10%~50%。而本研究结果显示,实验设计中的最低造模剂量即 10% CCl₄ 为宜,但更低剂量的造模效果还未知,后续实验将在此基础上,探讨更低剂量的造模效果以进行验证与完善。

实验中大鼠从 6 周末开始即出现了非正常死亡现象,死亡大鼠均出现了腹腔弥漫性腹水、肝脏严重缩小、血细胞明显减少等症状,结合血清转氨酶不升反降的现象,提示大鼠到 6 周后已处于肝硬化的失代偿期。此时其他脏器外观也发生明显改变,提示 CCl₄ 对大鼠肝脏和其他脏器造成了严重损伤,大鼠易出现并发症而引起死亡。

采用尿液¹H-NMR 代谢组学技术对造模过程进行了全程追踪,实验结果显示,CCl₄ 引起了大鼠体内代谢轮廓的显著变化,且随着造模时间的延长,变化愈来愈显著。与另一定量指标转氨酶相比,转氨酶变化更为灵敏,到第 2 周末开始,血清 ALT 和 AST 已经出现了显著变化,但随着造模时间延长,肝脏病变程度不断加重,后期却出现了降低现象,但代谢组学却直观显示了模型动物体内代谢轮廓偏离越来越严重的现象。表明代谢组学能够更加准确

图5 不同时间点大鼠尿液PLS-DA得分散点图和模型验证图

Fig. 5 PLS-DA score plots and model validation of rats' urine at different time points

和全面反映机体的整体代谢情况。且代谢组学研究所采用的尿液样本属于无创性取样,相比其他观测指标,代谢组学可以通过观察代谢物整体变化趋势判断动物体内代谢物变化轨迹,还可以通过差异代谢物变化的数量和程度来定量反映机体代谢轮廓偏离情况。

本研究采用尿液¹H-NMR代谢组学技术共寻找到差异代谢物15个。采用MetPA分析,结合Holm

*P*值、FDR和Impact值共发现6条重要的代谢通路,其中3条代谢途径:牛磺酸和亚牛磺酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢以及TCA循环,与Wu等^[19]对慢性肝损伤的尿液代谢组学研究结果一致。此外,本研究还发现3条通路:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,与慢性肝损伤关系密切。

柠檬酸、琥珀酸是三羧酸循环的中间产物,乳

表5 不同时间点大鼠尿液中差异代谢物偏离指数表

Table 5 Comparison of relative area of metabolites at different time in rats' urine

代谢物	相对峰面积/ $\times 100$				偏离率/%		
	造模0周	造模4周	造模6周	造模8周	造模4周	造模6周	造模8周
脂质	0.356 $\pm$ 0.029	0.318 $\pm$ 0.029*	0.243 $\pm$ 0.020*	0.318 $\pm$ 0.019*	10.61	—	—
异亮氨酸	0.118 $\pm$ 0.016	0.234 $\pm$ 0.045*	—	—	98.77	—	—
3-羟基丁酸	0.324 $\pm$ 0.016	0.239 $\pm$ 0.023*	1.340 $\pm$ 0.193*	1.719 $\pm$ 0.232*	26.41	313.15	429.98
丙氨酸	0.518 $\pm$ 0.136	0.187 $\pm$ 0.025*	—	0.055 $\pm$ 0.011*	63.99	—	89.43
琥珀酸	1.811 $\pm$ 0.301	0.265 $\pm$ 0.026*	0.159 $\pm$ 0.007*	0.012 $\pm$ 0.007*	85.36	91.24	99.32
苯丙氨酸	0.147 $\pm$ 0.020	0.398 $\pm$ 0.045*	—	0.021 $\pm$ 0.008*	169.88	—	86.02
乳酸	0.525 $\pm$ 0.400	—	0.491 $\pm$ 0.114*	—	—	6.52	—
柠檬酸	1.845 $\pm$ 0.472	—	0.134 $\pm$ 0.018*	—	—	92.75	—
卵磷脂	0.403 $\pm$ 0.103	—	0.334 $\pm$ 0.394*	—	—	17.22	—
牛磺酸	0.455 $\pm$ 0.172	—	0.068 $\pm$ 0.014*	—	—	85.01	—
β -葡萄糖	0.720 $\pm$ 0.078	—	0.256 $\pm$ 0.030*	—	—	64.38	—
肌酸	0.565 $\pm$ 0.044	—	0.023 $\pm$ 0.006*	0.045 $\pm$ 0.014*	—	95.93	92.09
氧化三甲胺	1.835 $\pm$ 0.467	—	—	1.286 $\pm$ 0.139*	—	—	29.94
甜菜碱	0.900 $\pm$ 0.099	—	—	0.153 $\pm$ 0.036*	—	—	83.00
尿嘧啶	0.482 $\pm$ 0.097	—	—	0.034 $\pm$ 0.014*	—	—	92.94
		DI			455.0	766.2	1081.9

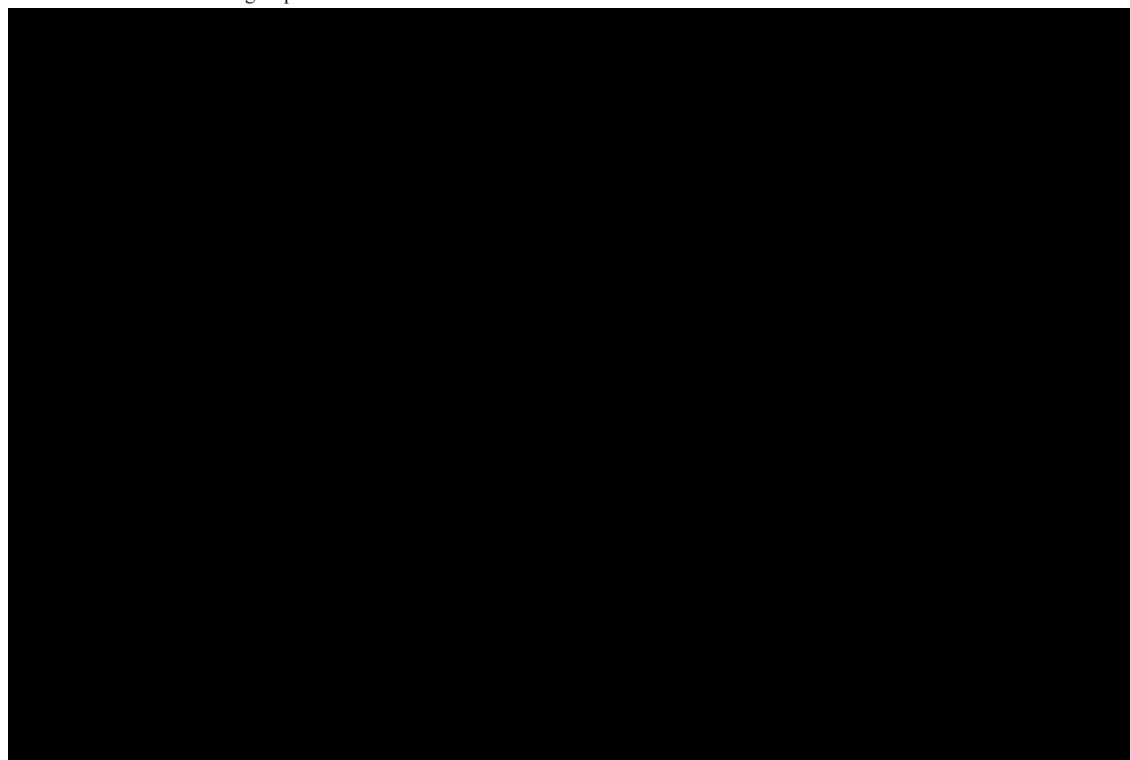
与造模0周比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图6 通路MetPA分析(A)和代谢产物富集(B)

Fig. 6 MetPA analysis of metabolomics pathway (A) and Enrichment of metabolite set (B)

酸是糖酵解途径的产物,柠檬酸、琥珀酸和乳酸浓度发生变化,说明大鼠体内有氧和无氧代谢均发生了异常。本研究中,琥珀酸含量在4、6、8周末分别偏离了85.36%、91.24%和99.32%。提示大鼠受

CCl_4 影响,能量代谢紊乱程度逐渐加重。这表明 CCl_4 诱导的慢性肝损伤大鼠中TCA循环的正常功能被破坏。大鼠给予 CCl_4 出现的体质量增长缓慢等现象,也与能量代谢密切相关。TCA循环是一种

重要的生物代谢途径,不仅涉及葡萄糖有氧氧化,还参与脂质氧化和氨基酸代谢的主要途径^[19]。脂质和卵磷脂是脂质代谢的产物,其浓度异常提示大鼠出现脂质代谢紊乱,可能是由于大鼠能量代谢异常,导致提供能量的途径由糖酵解向脂质代谢转化^[20]。肝脏是氨基酸代谢和核苷酸合成的主要器官,当肝脏受到CCl₄影响,氨基酸代谢会发生紊乱^[21]。大鼠尿液和肝脏中异亮氨酸、丙氨酸和苯丙氨酸水平异常,说明大鼠肝功能受到了严重损伤。尿液中丙氨酸、苯丙氨酸浓度的异常提示CCl₄引起了蛋白质降解^[22]。丙氨酸是嘧啶分解的产物,大鼠尿液中丙氨酸浓度的变化可能是氧化应激刺激促进了嘧啶代谢^[23]。牛磺酸是哺乳动物组织中一种非常重要的细胞内游离氨基酸,具有抗氧化活性,在肝脏氧化损伤方面发挥重要的作用。尿液中牛磺酸水平降低提示CCl₄引起了氧化应激损伤,可能激发了牛磺酸的抗氧化作用^[24]。

本研究通过体质量、脏器系数、肝脏外观和病理切片、血清生化检测和尿液¹H-NMR代谢组学观察,对CCl₄致大鼠慢性肝损伤模型剂量与时间进行评价,该研究对CCl₄致大鼠慢性肝损伤模型的复制和规范提供了充分的实验数据。

参考文献

- [1] 樊紫青. 贯叶连翘提取物对大鼠肝纤维化的保护作用及部分机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- [2] 朱颖炜. 转染TIMP-1-shRNA基因的骨髓间充质干细胞治疗大鼠肝纤维化[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [3] 侯艳锋. 益气养血化痰法通过调控NK细胞活性逆转大鼠肝纤维化的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [4] 尹连红, 于浩, 彭金咏. 四氯化碳诱导肝损伤的分子机制及中药干预的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1147-1155.
- [5] 王宇, 程微波, 张银柱, 等. 10%四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(5): 701-703.
- [6] 彭国苙. 基于尿液代谢组学的逍遥散抗抑郁临床疗效分析[D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [7] 中华医学会肝病学会. 肝硬化腹水及相关并发症的诊疗指南[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(1): 21-31.
- [8] 章丽金, 蔡立勉, 郑玉聪, 等. 表皮生长因子、神经降压素对四氯化碳损伤肝细胞钙离子及膜流动性的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(4): 218-220.
- [9] 王曾铎, 李宝杰, 高善铃, 等. 肝硬化、原发性肝癌患者血浆中分子物质、血清总胆红素、转氨酶测定的对比观察[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1993(1): 52-53.
- [10] Wei L, Liao P Q, Wu H F, et al. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by (1) H NMR spectroscopy [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 234(3): 314-325.
- [11] Feng JH, Liu HL, Bhakoo KK, et al. A metabonomic analysis of organ specific response to USPIO administration [J]. Biomaterials, 2011, 32(27): 6558-6569.
- [12] Xing J, Sun H M, Jia J P, et al. Integrative hepatoprotective efficacy comparison of raw and vinegar-baked Radix Bupleuri using nuclear magnetic resonance-based metabolomics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 138: 215-222.
- [13] Xia J G, Wishart D S. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Web Server issue): W71-W77.
- [14] Xia J G, Wishart D S. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization [J]. Bioinformatics, 2010, 26(18): 2342-2344.
- [15] 董婧婧, 刘艳菊, 陈祥胜, 等. 三七粉对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(8): 32-37.
- [16] 罗亦灵, 石磊, 王颖钰, 等. 复方龙葵颗粒对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 105-109.
- [17] 蔡纲, 李绍民. 翻白草对CCl₄所致慢性肝损伤大鼠肝脏保护作用的实验研究[J]. 中医药信息, 2017, 34(1): 13-16.
- [18] 苏远, 张小磊, 章礼久. 乌骨藤提取物对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(14): 1643-1648.
- [19] Wu F, Zheng H, Yang Z T, et al. Urinary metabonomics study of the hepatoprotective effects of total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity in rats using ¹H NMR analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 199-209.
- [20] Zhao X J, Huang C Y, Lei H H, et al. Dynamic metabolic response of mice to acute mequindox exposure [J]. J Proteome Res, 2011, 10(11): 5183-5190.
- [21] Eidi A, Mortazavi P, Behzadi K, et al. Hepatoprotective effect of Manganese chloride against CCl₄-induced liver injury in rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 155(2): 267-275.
- [22] Jiang L M, Huang J, Wang Y L, et al. Metabonomic analysis reveals the CCl₄-induced systems alterations for multiple rat organs [J]. J Proteome Res, 2012, 11(7): 3848-3859.
- [23] Ganie S A, Ehtishamul Haq, Akbar Masood, et al. Amelioration of carbon tetrachloride induced oxidative stress in kidney and lung tissues by ethanolic rhizome extract of *Podophyllum hexandrum* in Wistar rats [J]. J Med Plant Res, 2010, 4(16): 1673-1677.
- [24] Huxtable R J. Physiological actions of taurine [J]. Physiol Rev, 1992, 72(1): 101-163.