

观地模拟了药物与机体的相互作用过程,可更深入地揭示药物作用机制,使结果具有真实性和科学性。

本实验建立了测定血清中 TFRD 浓度的高效液相色谱方法,该方法准确、科学性强。根据不同时间的 HPLC 指纹图谱测定血药浓度,为在血清药理学方法中寻找一个合适的采血时间点提供一个更可行的手段,也为研究药物在体内的吸收、代谢及其作用机制提供了一个可靠的方法。由 TFRD 的药-时关系可知,血清药物浓度在 0~30 min 是逐渐上升的,在 30~60 min 是逐渐下降的,在 60 min 的血清中几乎已经没有药物。因此,确定 ig 后 30 min 为采血最佳时间点。由于中药试剂一般在给药 3 d 后才能观察到效果,并结合血清药理学实验中通常采用的给药方式^[9],在本实验过程中,采取了 1 日 2 次,给药 7 次的给药方案。

本实验从刺激小鼠脾淋巴细胞增殖、提高 NK 与 LAK 细胞杀伤活性以及增强巨噬细胞吞噬功能等方面对 TFRD 含药血清的活性进行了评价和分析,结果证实了 TFRD 含药血清对小鼠的细胞免疫功能如淋巴细胞增殖、巨噬细胞吞噬活性有一定的促进作用,对 NK 以及 LAK 细胞的杀伤活性表现出十分显著的促进作用。说明 TFRD 通过提高 NK 和 LAK 细胞的杀伤活力实现对小鼠细胞免疫功能的提升。

References:

- [1] Zheng W F, Chen C F, Shi F. HPLC Fingerprint of the roots of *Daphne genkwa* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药理学学报), 2005, 21(1): 4-8.
- [2] Zheng W F, Wang L, Shi F. Modulatory effects on cell immunity of mice by total flavonoids from *Radix Daphne Genkwa* [J]. *Pham J Chin PLA* (解放军药理学学报), 2004, 20(4): 241-245.
- [3] Zheng W F, Shi F. Three biflavonoids from ethanol extract of the roots of *Daphne genkwa* [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2005, 40(5): 438-442.
- [4] Ba D N. *Contemporary Immunological Technology and Application* (当代免疫学技术与应用) [M]. Beijing: Beijing Medical University and China United Medical University United Press, 1998.
- [5] Hu T, Geng P L. Effects of Fufang Pianji and Danweiyao on the chemical therapy-induced impairment of cytokines and NK cell activity [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2003, 19(9): 616-617.
- [6] Ogawa K, Nakada K, Yamashita S. Beneficial effects of the vegetable juice Aojiru on cellular immunity in Japanese young women [J]. *Nutr Res*, 2004, 24: 613-620.
- [7] Zhang S, Wang Q, Li W F, et al. Enhanced antitumor immunity by murine cytokine activated T lymphocytes after co-cultured with bone marrow derived dendritic cells pulsed with whole tumor lysates [J]. *Leukemia Res*, 2004, 28(10): 1085-1088.
- [8] Zhang Q H, Chen K J. The evaluation of application of serum pharmacology on Chinese materia medica and compound prescription [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1996, 16(3): 131.
- [9] Li Y K, Wu J Y. The current scheme of blood drawing on serum pharmacological experiment [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(6): 569-570.

关木通肾毒性的代谢组学研究

赵剑宇¹, 颜贤忠^{1*}, 彭双清²

(1. 军事医学科学院 国家生物医学分析中心, 北京 100850; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所

国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850)

摘要:目的 研究经关木通染毒后大鼠尿液的代谢表型改变及其与组织病理和尿液、血浆生化指标的相关性,探讨代谢组学在中药毒理学研究中的应用。方法 关木通分 4 个剂量组:36、32、28、24 g/kg, Wistar 大鼠连续 ig 给药 6 d, 12 h 后收集尿样,测定¹H-NMR 谱,并进行血浆生化指标和肾脏组织病理学检查。结果 染毒后,大鼠肾脏出现不同程度的炎症坏死,尿样中氧化三甲胺、柠檬酸、牛磺酸、肌酐、甜菜碱等代谢物均有不同程度的下降,而醋酸、丙氨酸则显著上升。主成分分析表明,给药组与对照组的代谢谱有明显差异,能够被区分开,而造成组间差异的主要影响因素是醋酸和氧化三甲胺的变化。不同剂量条件下,各组动物的代谢谱也各不相同,与肾脏病理和血浆生化改变相一致。结论 关木通能够对肾脏造成损害,且大鼠尿液的代谢物谱与关木通毒性作用强度密切相关,代谢组学分析方法在毒理学研究中有广泛的应用前景。

关键词:关木通; 肾毒性; 代谢组学; 核磁共振; 模式识别

中图分类号:R285.53

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0725-06

收稿日期:2005-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371705); 国家高技术研究发展计划项目(2002AA2Z342D)

作者简介:赵剑宇(1974—),男,湖南人,在读硕士研究生,主要从事中药毒性的代谢组学研究。

* 通讯作者 颜贤忠 Tel: (010) 66930305 E-mail: yanxz@nic.bmi.ac.cn

Metabonomics study on nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis*

ZHAO Jian-yu¹, YAN Xian-zhong¹, PENG Shuang-qing²

(1. National Center of Biomedical Analysis, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China;

2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To study the metabolic profiles in the urine samples of rats dosed with decoction of the caulis of *Aristolochia manshuriensis* and the relationship between the results of blood biochemical analysis and histopathological analysis, and to explore the feasibility of the application of NMR-based metabonomics to toxicology of Chinese medicine. **Methods** Male Wistar rats were administrated by ig 36, 32, 28, and 24 g/kg of *A. manshuriensis* or the equal volume of distilled water for 6 d, respectively. Urine were collected and their ¹H-NMR spectra were acquired, and then subjected to data process and principal component analysis (PCA). Blood biochemical analysis and histopathological examination were carried out. **Results** Compared to control groups, the urinary concentrations of TMAO, taurine, creatinine, DMG, citrate, and DMA in dosed groups decreased, while those of acetate, alanine, and some other amino acids increased to a great extent. The dosed groups can be readily discriminated from the controls based on PCA, with acetate and TMAO as main discriminators. A good agreement was achieved within clinical chemistry, microscopically examination and PCA data. **Conclusion** The caulis of *A. manshuriensis* can induce renal lesion as revealed by the metabonomic analysis of rat urine samples as well as blood biochemical analysis and histopathological examinations. The results show that the metabonomic approach is a promising new technology in toxicology.

Key words: the caulis of *Aristolochia manshuriensis* Kom.; nephrotoxicity; metabonomics; NMR; pattern recognition

早在 1993 年比利时学者 Vanherweghem 等^[1]报道,一些年轻妇女服用了含广防己、厚朴、关木通等中草药成分的减肥药后出现慢性肾功能衰竭,组织形态学主要表现为“进展性间质纤维化”,并称之为“中草药肾病”(Chinese herbs nephropathy, CHN),随后国内外大量学者开始关注 CHN。后来有学者提出 CHN 的主要成因是病人服用了含有马兜铃酸(aristolochic acid)成分的中草药,因此冠名为“马兜铃酸肾病”(aristolochic acid nephropathy, AAN)更为合适。国内外有关中草药不良反应的报道日见增多,使得中药安全性问题在国际上引起了重视^[2]。

近年来,国外开始探索利用代谢组学(metabonomics)^[3]进行早期药物毒性筛选。代谢组学主要利用核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)测定生物体液(如尿液、血浆、组织提取液等)中的内源性代谢产物,考察生物体系受到刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化,研究生物体系代谢途径,经过多元统计分析(如主成分分析,principal component analysis, PCA)^[4]确定内源性小分子代谢物成分的变化模式,对代谢产物谱进行动态追踪,从而反映出中毒或代谢损害而引起的细胞功能异常及其随

时间的变化过程。由此揭示的这种变化和传统毒理学终点相一致^[5]。

文献报道的一些实验研究表明^[6],关木通肾毒性临床上主要表现为非少尿性急性肾衰,病理表现主要为肾小管间质损伤或急性肾小管坏死,主要病变集中在皮髓交界区。本实验应用基于 NMR 的代谢组学方法,对关木通所致大鼠急性肾损伤的动物模型进行了研究,观察了关木通急性肾损伤作用的功能改变特点和病理学特点,以及关木通对大鼠代谢表型(metabotype)的影响。初步研究结果表明关木通对啮齿动物具有一定的肾毒性。本实验还探讨了 NMR 在代谢组学研究中的应用前景。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,雌雄,体重(220±20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供。军事医学科学院毒物药物研究所动物饲养房自然明暗周期,室温 25~28℃,动物自由摄食、饮水。

1.2 药材:关木通购自安徽省亳州市东郊药业公司中药材经营部,并经甘肃中医学院中药教研室郭玫教授鉴定为马兜铃科植物木通马兜铃 *Aristolochia manshuriensis* Kom. 的干燥藤茎,俗称关木通。

1.3 关木通水煎剂:由本实验室制备。取关木通 1 000 g,洗净,加入 6~8 倍自来水,浸泡 30 min,加

热至沸腾,煎煮 30 min,倾出药液;残渣再加入 4~6 倍自来水,浸泡 30 min,加热至沸腾,煎煮 30 min。合并两次药液,滤过、浓缩后制成 500 mL 水煎剂(相当于生药 2 g/mL),4 ℃ 放置备用。采用 HPLC 方法测得含马兜铃酸 A 0.058%。

1.4 仪器:Varian UNITY INOVA 600 兆超导脉冲傅里叶变换 NMR 谱仪,购自美国 Varian 公司;7020 全自动生化分析仪,购自日本日立公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法:每批 10 只,共 4 批,其中第 4 批体重为 (180±20) g。随机将 10 只大鼠分为给药组 6 只、对照组 4 只。给药组用关木通水煎剂(生药 2 g/mL)给大鼠 ig,1~4 批的剂量分别为 36、32、28、24 g/(kg·d),每天 1 次,连续 6 d ig 给药。对照组给予自来水。给药期间,大鼠自由饮食、饮水。试验结束后处死动物进行病理检查并采集血浆。

2.2 尿液的收集和处理:采用代谢笼法,从给药后开始每天收集 12 h 尿液,连续收集 8 d。代谢笼集尿器置于冰上,加入 1% NaN₃溶液作为防腐剂。对收集的尿液进行离心处理,取上清液,置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。NMR 测量前样品准备:在 400 μL 尿样中加入 200 μL 缓冲液(0.2 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄,pH 7.4),放置 10 min,4 ℃、3 000×g 离心 10 min;取上清液 500 μL,添加 50 μL D₂O,5 μL 0.1% TSP;转入 5 mm 样品管中进行测试。

2.3 血浆、尿液生化分析:离心制备血浆,用 7020 全自动生化分析仪测定血浆中的尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)。同时检测尿液如下生化指标:pH 值、葡萄糖(GLU)、蛋白质(PRO)、潜血(BLD)、酮体(KET)、胆红素(BIL)、尿胆素原(URO)、亚硝酸盐(NIT)。所有数据经 SPSS8.0 统计软件进行单因

素统计资料分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验。两样本率的比较采用四格表的确切概率法。

2.4 肾脏病理学检查:大鼠给药结束后,根据设计的时间剖杀大鼠,取出肾脏,生理盐水冲净表面血污,并依次经过 4% 中性福尔马林液固定、组织修切、石蜡包埋、常规切片、HE 染色、酒精梯度脱水、透明、封片、最后进行光学显微镜观察。

2.5 NMR 数据采集与分析:数据在 Varian UNITY INOVA 600 超导脉冲傅里叶变换 NMR 谱仪上采集。采用有预饱和的 1D NOESY 脉冲序列,取如下参数:谱宽 7 000 Hz,混合时间 0.15 s,弛豫延迟时间 2 s,采样点数 64 K,累加次数 128 次;在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰,谱仪偏置设置在水峰的位置。FID 信号经过傅里叶变换转换为 NMR 图谱,所用窗函数为 0.5 Hz 线增宽因子。以 TSP 为化学位移参考峰的位置,并定为 0。为统计处理时方便,利用 VNMR 软件的宏指令将同一组样本的 1D NMR 数据变成数组型的 1D 数据(arrayed 1D),然后进行 FT 变换,相位校正,基线校正。按默认范围(从 δ0.5~9.5,每段为 0.04)进行分段并积分,同时排除以溶剂峰为中心的部分(δ4.6~5.0)和包含尿素峰的部分(δ5.5~6.2),将所产生的所有积分数据归一化,以 Excel 文件格式贮存。

2.6 PCA 分析:将上述得到的数据文件利用 SIMCA-P10.0 软件包(瑞典,Umetrics AB,Umeå)进行 PCA 统计分析。

3 结果

3.1 大鼠行为与体重的变化:给药组与对照组比较,大鼠行为、体重发生明显改变。随着给药剂量增加,大鼠表现呆顿、倦怠,毛色干枯,食欲降低,体重减轻(见表 1)。

表 1 各组大鼠体重变化

Table 1 Weight changes of rat in each groups

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	体重/g					
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
关木通	36	6	200±5	199±5	197±6	194±5*	192±5*	189±4**
对照	—	4	194±6	196±5	198±6	201±5	202±6	204±6
关木通	32	6	203±5	201±4	196±4*	193±5*	190±5**	187±5**
对照	—	4	199±8	201±8	204±6	206±8	208±8	210±8
关木通	28	6	205±4	202±5	199±5	194±5**	192±6**	181±6**
对照	—	4	197±6	199±7	204±7	208±8	212±6	218±6
关木通	24	6	186±2	181±2	177±2	170±4**	164±4**	161±3**
对照	—	4	181±3	183±4	183±9	186±8	189±7	196±12

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

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

3.2 大鼠血浆生化分析:从表 2 中可知,与对照组相比,各给药组的 BUN 和 Cr 均升高,并呈剂量依赖性。结果说明关木通可引起明显的肾毒性。

3.3 大鼠尿量的动态变化与尿生化指标分析:由表 3 可知,大鼠尿量在给药后略有增加,但在第 3 天即开始减少,关木通 36 g/kg 组在第 4 天还进一步降低,而其他组则则在第 4 天开始回升,并且尿量逐渐增大至对照组的 3~4 倍。本实验对部分大鼠的尿样进行了生化分析,其中 GLU、PRO、BLD 和 pH 值在给药后有一定的增加,并且关木通剂量越大,变化越明显;而 BIL、URO、KET 则未见改变。

3.4 大鼠肾脏组织病理学检查:给药组大鼠肾脏大

表 2 各组大鼠血浆 BUN 和 Cr 的变化
Table 2 Changes of BUN and Cr in plasm
of rat in each groups

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物/ 只	BUN/ (mmol · L ⁻¹)	Cr/ (μmol · L ⁻¹)
关木通	36	6	68.20±42.63**	141.78±170.24
对照	—	4	7.01± 1.16	23.38± 2.03
关木通	32	6	37.41± 5.50*	92.88± 74.42
对照	—	4	7.77± 1.06	35.33± 15.53
关木通	28	6	24.50±12.39**	63.19± 62.41
对照	—	4	8.60± 0.66	23.32± 0.80
关木通	24	6	17.25± 7.11**	26.37± 12.18
对照	—	4	6.65± 0.87	20.20± 2.77

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

表 3 各组大鼠尿量的变化

Table 3 Changes of urine volume of rat in each groups

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物/ 只	尿量/mL							
			d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	d ₅	d ₆	d ₇	d ₈
关木通	36	6	11±6	15±7	13±3*	8±2	16±4**	26±5**	34±8**	38±7**
对照	—	4	9±1	9±1	9±2	8±1	9±1	10±2	10±1	9±1
关木通	32	6	9±1	11±2*	9±1	15±4**	20±3**	27±3**	34±6**	
对照	—	4	8±1	8±1	8±1	8±1	8±1	10±1	10±1	
关木通	28	6	10±2	13±2**	9±1	15±3**	23±3**	30±2**		
对照	—	4	8±1	7±1	9±1	7±1	9±1	10±1		
关木通	24	6	10±1*	13±3*	9±1	18±2**	22±2**	26±5**		
对照	—	4	8±1	8±1	8±1	8±1	9±1	10±1		

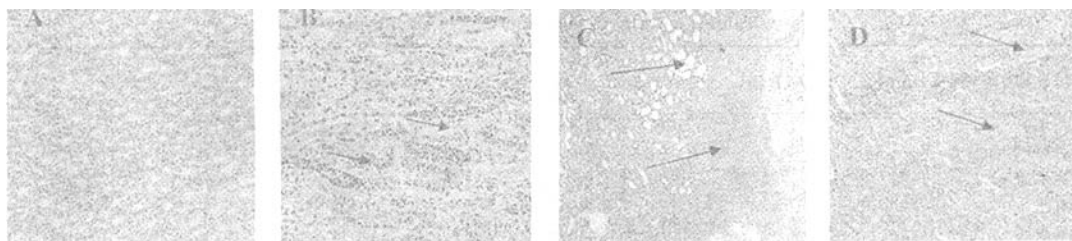
与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

体解剖无明显外观改变,但形成肿块,肿块大小不一。外观可见白色点状颗粒,切面观可见肿块在皮质或皮髓交界处呈浸润性或囊性生长。肾脏病变主要位于皮髓交界处,可见皮髓交界处 90%~100% 肾小管上皮细胞坏死脱落,胞浆与基底膜分离。皮质区小管上皮细胞可见空泡性、坏死,部分刷状缘及胞浆脱落。髓质区小管上皮细胞也可见空泡变性,可见较多小管上皮细胞扁平,管腔内可见大量蛋白,系膜基质轻度增生。肾小球部分毛细血管襻开放欠佳,肾间

质血管基本正常,可见个别血管内皮细胞增生,髓质区部分管周毛细血管内可见大量红细胞。肾间质未见水肿、增宽及炎细胞浸润。间质内纤维组织弥漫性增生、变性,部分间质区域水肿,多数小管萎缩、消失、少数呈囊性扩张,小管上皮细胞变性,管腔内偶见残存肾小球,病变区域与正常肾组织区域无明显分界(图 1)。

3.5 NMR 图谱及模式识别分析:从大鼠尿样的 ¹H-NMR 谱(图 2)可看出,大鼠尿样的内源性代谢



A-对照组 B~D-36、32、28 g/kg 关木通组

A-control group B-D-36, 32, and 28 g/kg *A. manshuriensis* groups

图 1 各组大鼠肾脏组织病理变化

Fig. 1 Changes of renal histopathology of rat in each groups

物谱随给药过程而不断变化。各主要谱峰的归属为:肌酸(1号峰, 3.05、3.92)、Cr(2号峰, 3.04、4.05)、牛磺酸(3号峰, 3.29、3.42)、氧化三甲胺(4号峰, 3.28)、2-酮戊二酸(5号峰, 2.44、3.02)、柠檬酸(6号峰, 2.54、2.68)、醋酸(7号峰, 1.92)、乳酸(8号峰, 1.35)、琥珀酸(9号峰, 2.40)、甲胺(10号峰, 2.12)、二甲胺(11号峰, 2.24)、二甲甘氨酸(12号峰, 2.93)等,其中许多成分都有明显的改变。醋酸的谱峰在整个过程中不断增强,而柠檬酸和氧化三甲胺的峰则在给药过程中逐渐减弱,在停止给药(第7d)后又开始恢复。牛磺酸和琥珀酸也有类似的变化过程。而丙氨酸(13号峰)则是先增强,而后减弱。从图3中可以看出,给药组与对照组的代谢物成分差别很大。PCA结果表明(图4),给药组与对照组大鼠尿样沿第一主成分分布,互不重叠,能够被区分开来,表明其代谢谱是有差别的。从主成分分析的因子载荷图中可以看出(图5),大多数点集中在原点附近,只有少数点远离原点,正是这些点所代表的化合物造成了两组间差异。其中典型的代表化合物是醋酸和氧化三甲胺。

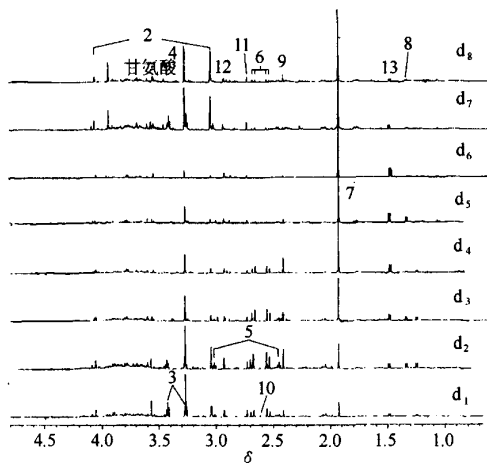


图2 关木通 36 g/kg 组大鼠尿样的 600 MHz NMR 氢谱随时间的变化

Fig. 2 600 MHz ^1H -NMR Spectra of urine samples of rat in 36 g/kg *A. manshuriensis* group

4 讨论

本实验结果表明,以常规的血浆生化改变和肾脏组织病理学异常作为判断标准,关木通对大鼠具有明显的肾毒性,并有一定的量效关系。这与已有的文献报道是一致的。关木通肾毒性对肾脏的损伤作用,表现为急性肾小管坏死,病变累及各段肾小管,表现为低渗尿、尿量增加;肾间质浸润细胞少,未见水肿、增宽、纤维化现象;肾小球病变不明显,仅表现

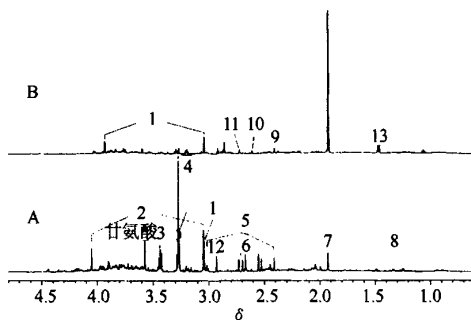


图3 连续给药 6 d 后,对照组大鼠(A)和关木通 36 g/kg 组大鼠(B)尿样的 600 MHz NMR 氢谱图

Fig. 3 600 MHz ^1H -NMR Spectra of urine samples of normal rat (A) and rat in 36 g/kg *A. manshuriensis* group (B) after 6 d administration

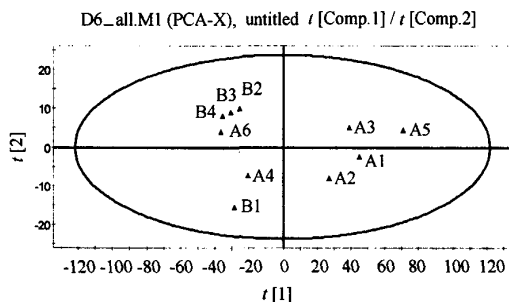


图4 关木通 36 g/kg 组(A)和对照组(B)大鼠给药第6天尿样的主成分分析得分图

Fig. 4 Score plot of PCA analysis of urine NMR spectra of urine samples from rat in 36 g/kg *A. manshuriensis* group (A) and rat in control group (B) at day 6

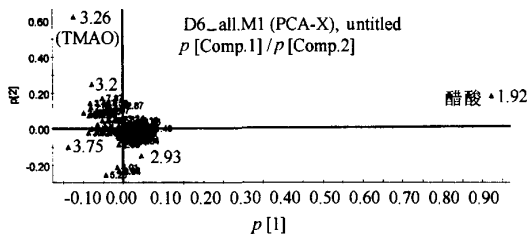


图5 关木通 36 g/kg 组(A)和对照组(B)大鼠给药第6天尿样的主成分分析的因子载荷图

Fig. 5 Loading plot of PCA analysis of urine NMR spectra from rat in *A. manshuriensis* 36 g/kg group (A) and rat in control group (B) at day 6

为轻度系膜基质增生和部分毛细血管襻开放欠佳等。肾脏组织形态学检查证实了关木通对肾小管的损伤作用,主要病变集中在皮髓交界区,该处包含近曲小管直部、髓襻升支粗段以及外髓集合管外带,对肾中毒引起的缺血、缺氧的变化最为敏感。

由动物尿液的¹H-NMR 谱及综合分析,可知关木通的毒性反应与剂量呈较强的对应关系,由上述分析可知:肌酸、牛磺酸、*N*-氧化三甲胺、2-酮戊二酸、柠檬酸、醋酸、乳酸、琥珀酸、丙氨酸、甲胺、二甲胺、二甲甘氨酸等主要的代谢物的峰改变最为明显,其中丙氨酸和醋酸呈明显增加,而其他的代谢产物则是逐渐减少。PCA 分析表明给药组和对照组能够被完全区分开来,对组间差异贡献最大的主要代谢物是醋酸和氧化三甲胺。这些化合物的变化与已报道的肾毒性化合物引起的变化相似^[7]。而乳酸、柠檬酸等均与三羧酸循环能量代谢及糖酵解途径密切相关。这些代谢物的变化说明动物尿液代谢组学分析能够较好地反映关木通的肾毒性特征。

与常规的临床生化检验及组织病理学检查相比,代谢组学分析具有多种过去常规检验方法无法比拟的优势。第一,代谢组学分析具有简单、快捷等特点。基于核磁共振的代谢组学技术可以应用于中药毒性研究和中药药理的研究,能够满足药物早期毒性筛选的要求,因此越来越广泛地应用于药物筛选与临床疾病诊断^[8,9]。第二,代谢组学分析的灵敏性要高于其他常规检验方法。如本实验中的给药组与对照组尿液的¹H-NMR 谱图很容易区分开来,并且低剂量与高剂量也很容易区分。利用相同原理可以对中药药材和制剂进行质量控制。第三,代谢组学分析可提供非常有价值的生物标志物^[10]和作用机制信息^[11]。生物标志物可为临床试验选择检验指标提供可靠有效的依据,而作用机制信息有助于设计有针对性的体外筛选模型,代谢组学技术在新药研发与中药现代化研究中可以发挥巨大的作用。当然,NMR 技术有其固有的缺点,就是灵敏度较低,因此,对生物体液中水平较低的代谢产物,可以采用 LC-MS 联用技术。NMR 和 LC-MS 相互补充,是代谢组学研究中最重要两种技术手段。

近年来,中药的肾脏毒性问题已经引起了广泛的关注,但研究还不是很全面,受实验手段及条件的限制,其机制的研究还局限于中药某一单一化学成分肾毒性研究上。目前尚无中药毒性作用评价的标准及客观依据,也无安全性评价的统一标准。随着中药现代化的实施,中药毒理学研究亟待加强,需要

制定中药的安全性评价规范,应用现代科技手段对常用中药进行安全性评价,确立与国际接轨的安全性评价标准和指标。显然,基于 NMR 技术的代谢组学为中药安全性研究提供了崭新的技术手段。

致谢:本课题在研究过程中得到军事医学科学院毒物药物研究所袁本利副研究员在组织病理学分析、沈伽弟高级实验师在血尿生化分析方面的大力协助。

References:

- [1] Vanherweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, *et al.* Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young woman: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. *Lancet*, 1993, 341(8842): 387-391.
- [2] Hu J G, Long S J, Gu J. Clinical characteristics of nephrotoxicity of *Caulis Aristolochiae Manshuriensis* and related experimental research [J]. *World Sci Technol Mode: Tradit Chin Med* (世界科学技术:中医现代化), 2003, 5(2): 31-36.
- [3] Nicholson L 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(2): 1181-1189.
- [4] Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance [J]. *Prog NMR*, 2001, 39(1): 1-40.
- [5] 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.
- [6] Chen Y P, Chen W. Research development of aristolochic acid nephropathy [J]. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 2002, 11(1): 63-66.
- [7] Beckwith-Hall B M, Nicholson J K, Nicholls A W, *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins [J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11(4): 260-272.
- [8] Holmes E, Nicholson J K, Tranter G. Metabonomic classification of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(2): 182-191.
- [9] Holmes E, Nicholls A W, Lindon J C, *et al.* Chemometric models for toxicity based on NMR spectra of biofluids [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(6): 471-478.
- [10] Holmes E, Nicholls A W, Lindon J C, *et al.* Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H-NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition [J]. *NMR Biomed*, 1998, 11(4-5): 235-244.
- [11] Anthony M L, Sweatman B C, Beddell C R, *et al.* Pattern recognition of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine [J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 46(1): 199-211.