

· 中药药理 ·

基于 $^1\text{H-NMR}$ 的中西药干预 Wilson 病铜负荷大鼠肝损伤代谢组学研究*

张娟¹ 谢道俊¹ 鲍远程¹ 许晶晶² 沈桂平^{2#} 韩辉¹ 董婷¹ 黄晓峰¹

(1 安徽中医药大学第一附属医院 安徽 230031; 2 厦门大学电子科学与技术学院)

摘要: 目的 从代谢组学角度探讨中西药对 Wilson 病(WD)铜负荷大鼠模型肝损伤代谢网络的干预机制。方法 105 只大鼠按照随机数字表分为 7 组,每组 15 只,分别为对照组、模型组、肝豆灵组、青霉胺组、谷胱甘肽组、SB203580 组、SB203580 肝豆灵组,按照文献方法复制 Wilson 病铜负荷大鼠模型,共计 12 周。从第 7 周开始,各干预组予以等效剂量相应药物,对照组和模型组予以等容量生理盐水灌胃,直至模型复制结束。采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术结合多元统计方法,阐述 Wilson 病肝损伤的肝脏代谢轮廓变化及分析不同治法对其生物标志物的干预作用。结果 WD 铜负荷大鼠模型肝脏发生明显纤维化改变,不同方法干预后肝纤维化可不同程度减轻。WD 铜负荷大鼠模型肝脏酮体代谢含量升高,肌酸含量下降;青霉胺干预后,谷胱甘肽、天冬氨酸盐、肌酸、氨基酸、缬氨酸、酪氨酸、组氨酸、嘧啶、嘌呤含量上升;SB203580 肝豆灵组,肌酸上升,甲胺下降;谷胱甘肽及 SB203580 组,谷胱甘肽、缬氨酸、组氨酸、嘧啶、嘌呤含量上升。结论 中西医不同干预方法影响 WD 铜负荷大鼠肝脏组织谷胱甘肽、肌酸、酮体、氨基酸、嘧啶、嘌呤代谢,并有调节以上小分子物质代谢紊乱的作用,进而对 WD 铜负荷大鼠肝损伤有一定的修复作用。

关键词: 肝豆状核变性;肝损伤;中西药;代谢组学;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2019.12.008

中图分类号: R285.5

$^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics investigation into intervention with Chinese herbs and conventional pharmaceuticals of copper-overload-induced liver injury in rats with Wilson's disease*

Zhang Juan¹, Xie Daojun¹, Bao Yuancheng¹, Xu Jingjing², Shen Guiping^{2#}, Han Hui¹, Dong Ting¹, Huang Xiaofeng¹

(1 Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui 230031, China; 2 School of Electronic Science and Engineering, Xiamen University, Fujian 361005, China)

Abstract: Objective To explore the intervention mechanism of Chinese medicinal herbs and conventional pharmaceuticals on copper-overload-induced liver injury in rats with Wilson's disease (WD). **Methods** 105 Wistar rats were randomly divided into 7 groups (15 in each group), including control group, model group, Gandouling (GDL) group, penicillamine group, glutathione group, model + SB203580 group, and GDL + SB203580 group. Rat models with copper overload were firstly established in 12 weeks according to relevant literature. Since the 7th week, all intervention groups were given intragastrically corresponding medicinals respectively in equivalent dose. Meanwhile, the control group and the model group were given the same volume of saline intragastrically until the models were established. Then $^1\text{H-NMR}$ metabolomics technology was used in combination with multivariate statistic analysis to elucidate the changes in liver metabolic profile caused by liver injury in rats with WD and to analyze the intervention effects of different treatments on its biomarkers. **Results** Obvious fibrosis was

张娟,女,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师

通信作者:沈桂平,男,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向:核磁共振方向研究, E-mail: gshen@xmu.edu.cn

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81774299),安徽省自然科学基金面上项目(No. 170805MH199)

detected in copper-laden rats with WD, and liver fibrosis could be alleviated in different degrees with intervention in all treatment groups. There were an increase in metabolic content of ketones and a decrease in creatine content in the liver of the rat models. After intervention with penicillamine, there were increases in contents of glutathion, aspartic acid, creatine, amino acid, valine, tyrosine, histidine, pyrimidine and purine; with GDL and SB203580, increases in creatine and decreases in methylamine; and with glutathione and SB203580, increases in the contents of glutathione, valine, histidine, pyrimidine and purine. **Conclusion** Different interventions with Chinese medicinal herbs and conventional pharmaceuticals regulated metabolic disorders of such small molecules as glutathion, creatine, ketosome, amino acid, pyrimidine and purine in liver tissue of copper-laden rats with WD and hence can repair to some extent the copper-overload-induced liver injury in rats with WD.

Keywords: hepatolenticular degeneration; liver injury; Chinese medicinal herbs and conventional pharmaceuticals; metabonomics; rats

Corresponding author: Associate Prof. Shen Guiping, Ph. D., Master's Supervisor. Xiamen University. No. 422, Siming South Road, Siming District, Xiamen 361005. E-mail: gpshen@xmu.edu.cn

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81774299), Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 170805MH199)

Ethical review: Committee of Ethical Review on Medical and Experimental Animals in The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine (No. AHAU2018008)

Conflicts of interest: None

Wilson 病 (Wilson's disease, WD) 又称肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration), 是 ATP7B 基因突变引起常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病^[1], 铜在肝、脑、角膜、肾等组织脏器过度沉积, 导致进行性加重的肝脏、神经系统、肾损害等临床症状, 严重者可危及生命。WD 患者临床表现累及多个系统, 但以肝病起病较多, 且多见于年龄较小的幼儿。WD 患者自出生后铜在肝脏内即过度蓄积, 故大多数患者初次就诊时已发生肝损伤。

代谢组学从生物代谢网络影响的角度, 对比分析中西药干预前后小分子代谢物的变化, 从分子生物学角度探讨 WD 的内在机制, 来证实药物作用的物质基础和疗效。其中, $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学具有良好的客观性和重现性, 可同时检测多种代谢物, 对所有化合物保持灵敏度一致, 图谱中的信号峰强度与其浓度成正比, 可直接比较相应浓度, 进行定量分析^[2], 是当前代谢组学研究中的主要技术。

本文通过中西药干预 WD 铜负荷大鼠模型, 采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术结合多元统计方法, 寻找并解释标记物归属, 联系机体代谢通路和代谢网络, 阐述 WD 肝损伤的肝脏代谢轮廓变化及分析不同治法对 WD 肝损伤生物标志物的干预作用, 探索最有效的干预方法, 为 WD 肝损伤的临床治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物

实验用清洁级 Wistar 大鼠 105 只, 雌雄各半, 月

龄 3 个月, 平均体重 (200 ± 20) g, 购于安徽医学科学研究所实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (苏 2008-0004), 动物饲养于安徽中医药大学清洁级实验室, 实验前先适应性饲养 1 周。

1.2 伦理审查

实验方案经安徽中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准, 伦理审批号: AHAU2018008。

1.3 药物

肝豆灵 (安徽中医药大学第一附属医院院内制剂中心生产, 0.3 g/片, 批号: 皖药制字 Z20050071), 由大黄、黄连、丹参、金钱草、姜黄、莪术等组成; 青霉胺: 0.125 g/片, 上海信谊药厂有限公司生产, 批号为 052180603; 谷胱甘肽: 0.1 g/片, 重庆药友制药生产, 批号为 19041100。

1.4 试剂及仪器

SB203580 (美国 Calbiochem 公司); 硫酸铜 (天津巴斯夫化工公司); 重水 (D_2O) (美国 CIL 公司); $2,2,3,3$ -四甲基甲硅烷基丙酸 (TSP, 美国 Aldrich 公司); 图像采集及图像分析系统 (美国 Bio-Rad 生物仪器设备公司); Varian NMR System 500 MHz 超导 NMR 谱仪 (美国瓦立安公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

按随机数字表法将 105 只大鼠分为 7 组, 每组 15 只, 分别为对照组、模型组、肝豆灵组、青霉胺组、谷胱甘肽组、SB203580 组、SB203580 肝豆灵组。

SB203580 为 p38MAPK 选择性抑制剂。

2.2 造模方法

从实验第1天开始,除对照组予以普通饲料,治疗组均参照文献[3]方法复制铜负荷大鼠模型,即予含铜(1 g/kg)饲料和含铜(0.185%)的水,造模12周;各组大鼠每天每只进食相等,并自由饮水。

铜负荷大鼠用药剂量均按体表面积换算法,根据成人每日使用剂量换算。从第7周第1天开始各用药组大鼠均每日晨灌胃相应药物 200 mL/kg,每日1次,共6周。中药肝豆灵组予以肝豆灵 0.486 g/(kg·d),青霉胺组予青霉胺 0.09 g/(kg·d);谷胱甘肽组予谷胱甘肽片 0.2 g/(kg·d);SB203580组:以 SB203580 5 mg/(kg·d)腹腔注射;SB203580肝豆灵组同时予以肝豆灵及 SB203580,对照组和模型组给予等量生理盐水。

2.3 标本留取

各组大鼠在第13周实验结束后,禁食12 h,2%的戊巴比妥钠腹腔麻醉下处死,留取肝组织标本。部分肝组织液氮速冻后存于-80℃冰箱,用于代谢组学测定;另将部分浸泡于10%的多聚甲醛溶液,固定24 h后进行常规石蜡包埋,用于病理学检测。

2.4 肝组织病理检查

将石蜡包块制成4 μm厚的石蜡切片,行HE及Masson染色,光镜下观察肝组织形态结构变化。

2.5 代谢组学检测

在NMR分析之前,使用改进的Bligh-Dyer方法萃取组织样品。将100 mg大鼠组织样品与400 μL甲醇和125 μL去离子水混合,用匀浆机在4℃下匀浆30 s后,将匀浆转移至2.5 mL管中,再向每个管中加入氯仿和去离子水各400 μL,并将混合物涡旋60 s。在冰上静置10 min后,将样品在10 000 r/min和4℃条件下离心5 min。将上层上清液转移至1.5 mL试管中,冻干24 h以除去甲醇、氯仿和水,最后取出冻干粉于-80℃下储存备用。

将给药大鼠肝脏组织冻干粉样品溶于450 μL的重水(纯度为99.9%)和150 μL的磷酸钠缓冲液(90 mmol/L,pH 7.4,含0.02% TSP)的混合液中,在室温下静置5 min,然后在6 000 r/min和4℃条件下离心10 min,以除去悬浮物。最后再将550 μL上清液转移至5 mm核磁共振管中,并在4℃下储存以备进行NMR实验。

所有的¹H-NMR实验在Varian NMR System 500 MHz谱仪上进行,该谱仪配备有5 mm主动屏蔽

*x y z*轴梯度的反式检测探头,实验温度为16℃。实验采用具有压水模块的一维脉冲序列NOESY(NOESYPR1D)(RD-90°-*t*₁-90°-*t*_m-90°-Acq)进行波谱采集,具体的实验参数如下:90°脉冲宽度10 μs,累加次数64次,采样点数32 K,谱宽10 kHz,采样时间为1.8 s,弛豫延迟为4.0 s,固定间隔*t*₁为4 μs,混合时间*t*_m为120 ms。

2.6 数据处理分析

实验所有的NMR波谱都用软件Mest Re Nova预处理。在傅里叶变换之前,经核磁共振谱仪采样得到的自由感应衰减(FID)信号用零填充到64 k数据点,并以0.3 Hz指数线宽因子对信号进行指数加窗。傅里叶变换之后,对所有的波谱进行相位校正和基线校正,将内标TSP峰的化学位移定为0.0 ppm。从波谱中去除残余水峰(δ 5.0~4.7),TSP峰(δ 0.0),残余甲醇峰(δ 3.37~3.34)和无峰基线的波谱区域。采用自适应峰积分的方式,将所有处理的数据采用全谱归一化用于多变量统计分析。

将预处理过的NMR数据导入SIMCA软件进行多变量统计分析。对归一化的波谱数据首先进行主成分分析(PCA),各组之间的代谢轮廓运用帕累托(Pareto)换算模式进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)。为了更好地了解各组间的具体代谢差异,对数据进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),并用7折交叉验证、排列检验(排列次数*n*=200),来自交叉验证和置换测试的参数*R*²和*Q*²表示建模拟合程度和预测能力。

3 结果

3.1 肝组织病理学变化

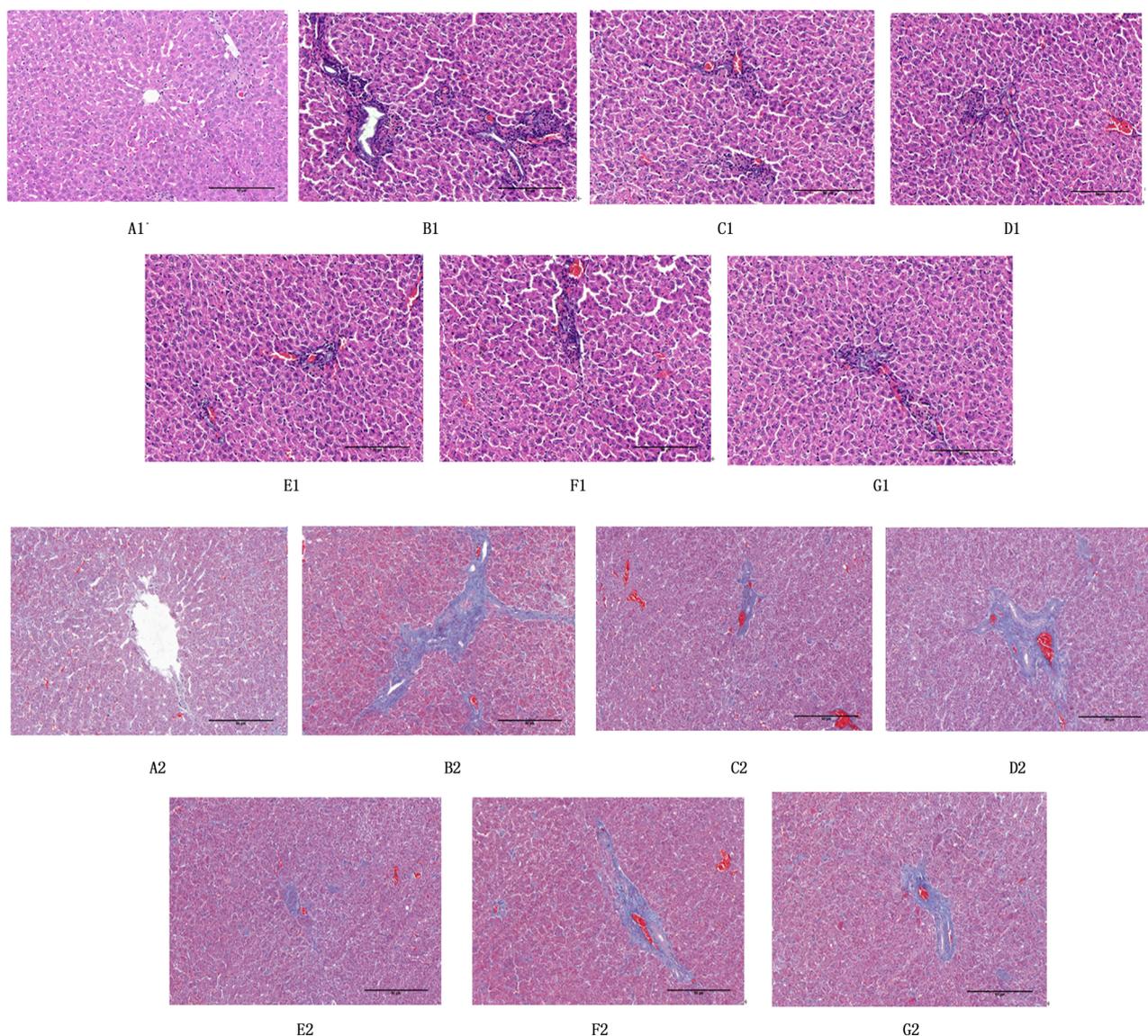
HE染色结果显示,对照组肝细胞核较大,形态呈圆形,居中,异染色质少而着色浅,核仁清晰可见。肝细胞胞质丰富,多嗜酸性。肝小叶结构完整,与对照组相比,模型组肝细胞汇管区有较多的炎性细胞浸润,各治疗组炎性细胞浸润明显减少,见图1。

Masson染色结果显示:对照组肝小叶结构正常,中央静脉或汇管区周围少有蓝色纤维染色。与对照组相比,模型组汇管区可见蓝色纤维化扩大,纤维间隔形成并伴肝小叶结构紊乱,各治疗组中央静脉间短纤维间隔形成,较模型组明显减少,见图1。

3.2 大鼠肝脏代谢变化分析

3.2.1 不同模型肝脏组织的代谢轮廓

通过查阅文献和搜索公共代谢物数据库,总共



A: 对照组; B: 模型组; C: 青霉胺组; D: 肝豆灵组; E: SB203580 肝豆灵组; F: 谷胱甘肽组; G: SB203580 组; 1: HE 染色; 2: Masson 染色。
标尺 = 50 μm 。

A: control group; B: model group; C: penicillamine group; D: GDL group; E: GDL + SB203580 group; F: glutathione group; G: SB203580 group;
1: HE; 2: Masson. Scale = 50 μm .

图 1 空白组、模型组及各治疗组大鼠肝组织病理变化 ($\times 200$)

Fig. 1 Pathological changes in liver tissue of rats in each group ($\times 200$)

归属出 48 种代谢物,并在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中进行标注。图 2 显示了含几种不同模型组肝脏组织的典型 500 $\text{mHz}^1\text{H-NMR}$ 谱。

然而,直接通过谱图的视觉比较并不能提供详细的生物学信息,从而客观系统评估模型之间的相似性和差异性,多变量统计分析可能有助于分析这些特定的生物代谢信息。

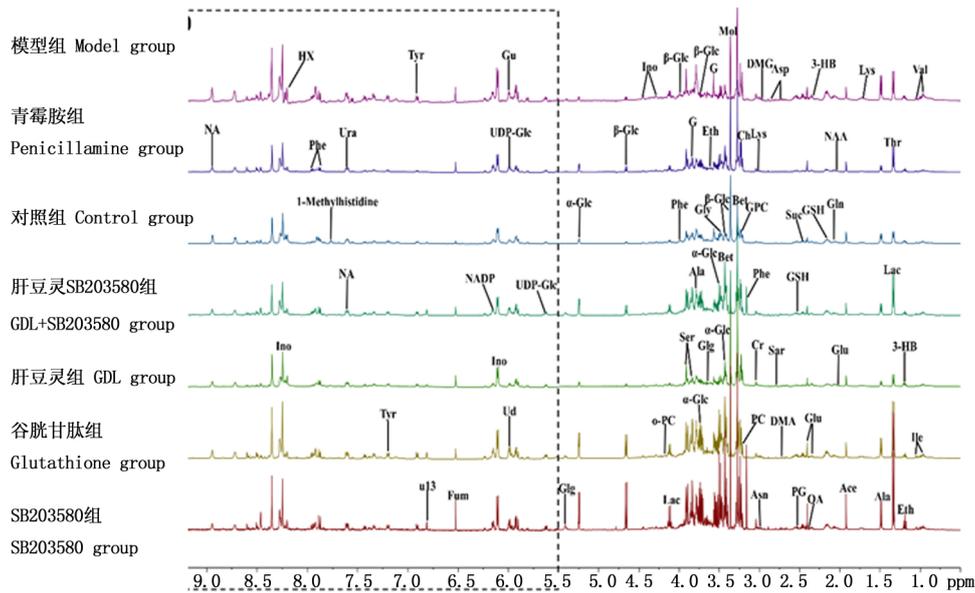
3.2.2 给药大鼠 PCA 及 PLS-DA 分析

从 PCA 得分图可以看出,第一、第二主成分共

解释了 63.17% 的方差。PCA 得分图中,各组之间有明显的重叠,表明可能各干预组的肝脏代谢物非常相似以致于难以被明显区分。PLS-DA 得分图突出了各组之间的分离,但得分图的明显重叠仍然存在,这意味着肝脏中模型组、肝豆灵组和对照组之间的新陈代谢具有部分相似性。结果见图 3。

3.2.3 OPLS-DA 分析

为了找出每个模型有显著意义的差异代谢物,需要构建正交偏最小二乘判别分析模型(OPLS-DA),



注: 虚线框中的谱图区域(δ 5.5 ~ 9.5) 相比虚线框外的谱图区域(δ 0.5 ~ 5.5) 放大 10 倍。
 Note: The spectral region inside the dotted box (δ 5.5 ~ 9.5) is shown 10 times in scale of that outside it (δ 0.5 ~ 5.5).

图 2 各组大鼠肝脏典型 500 mHz ¹H-NMR 谱(δ 0.5 ~ 5.5 和 δ 5.5 ~ 9.5)
 Fig. 2 Typical 500 mHz ¹H-NMR spectra of liver in rats of each group (δ 0.5 ~ 5.5 and δ 5.5 ~ 9.5)

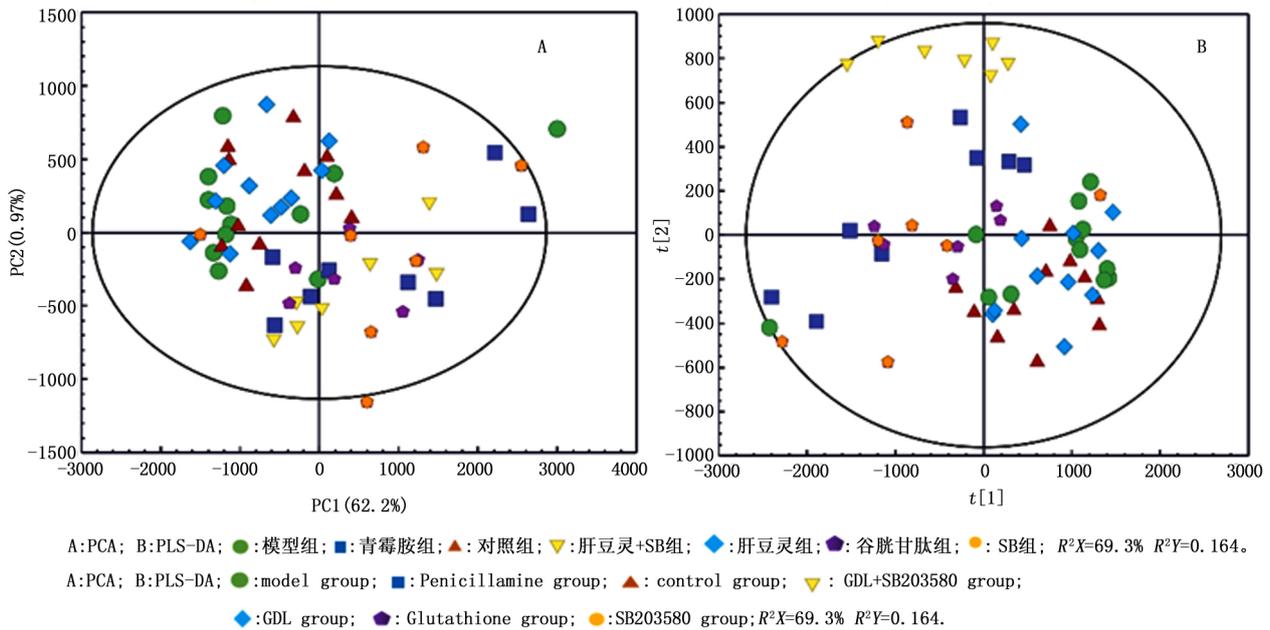


图 3 大鼠肝脏不同实验组的 PCA、PLS-DA 得分图
 Fig. 3 PCA/PLS-DA score map of liver of rats in each group

并通过交叉验证判断模型的准确性。由 OPLS-DA 分析得知 除了肝豆灵组与模型组外,其余实验组与模型组都具有较好的组间区分,且采用 200 次($n = 200$)的排列检验来验证上述模型的可信度。证明

肝豆灵组与模型组在多变量模型中没有显著差异。
 3.2.4 差异性代谢物及代谢通路分析

通过基于 KEGG 数据库和 MetaboAnalys 的代谢通路分析 根据模型变量的 VIP 值和 t 检验结果,筛

选出对组间区分贡献较大的代谢物,整合大鼠肝脏组织中不同实验组与对照组的差异代谢物,明确铜负荷模型大鼠肝脏组织中代谢通路的变化,有助于从代谢层面上进一步了解给药大鼠的代谢途径,进而做出能反映大鼠肝脏组织代谢变化的综合代谢网络。共筛选出 15 种差异性代谢物(见表 1): 苯基丙

氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,赖氨酸,次黄嘌呤,肌苷,肌酸,α-氨基对羟苯丙酸,谷氨酸酯,谷氨酰胺,谷胱甘肽,N-乙酰天冬氨酸,β-羟基丁酸,二甲胺,甜菜碱;有显著性的代谢通路及潜在的靶标代谢通路(见图 4) 主要有: ①谷胱甘肽代谢;②肌酸代谢;③酮体代谢④氨基酸代谢;⑤嘧啶代谢;⑥嘌呤代谢。

表 1 铜负荷大鼠肝脏组织中不同实验组与模型组的差异代谢物

Table 1 Differences in metabolites between the experimental groups and the model group in liver tissue of copper-laden rats

代谢代 Metabolites	青霉胺组 Penicillamine group		对照组 Control group		SB203580 肝豆灵组 GDL + SB203580 group		谷胱甘肽组 Glutathione group		SB203580 组 SB203580 group	
	Fold	r	Fold	r	Fold	r	Fold	r	Fold	r
	苯基丙氨酸 Phenylalanine	2.149	0.865	-	-	-	-	-	-	-
异亮氨酸 Isoleucine	2.116	0.869	-	-	-	-	2.096	-0.768	-	-
缬氨酸 Valine	1.993	0.860	-	-	-	-	2.017	-0.812	1.925	-0.762
赖氨酸 Lysine	2.157	0.851	-	-	-	-	-	-	-	-
次黄嘌呤 Hypoxanthine	2.756	0.833	-	-	-	-	2.552	-0.888	2.330	-0.850
肌苷 Inosine	2.872	0.831	-	-	-	-	2.609	-0.916	2.401	-0.889
肌酸 Creatine	3.012	0.842	2.190	0.768	3.513	-0.756	-	-	-	-
酪氨酸 Tyrosine	2.073	0.768	-	-	-	-	-	-	-	-
谷氨酸酯 Glutamate	1.893	0.767	-	-	-	-	1.849	-0.711	1.856	-0.722
谷氨酰胺 Glutamine	1.802	0.702	-	-	-	-	1.909	-0.783	1.890	-0.808
谷胱甘肽 Glutathione	1.932	0.708	-	-	-	-	1.916	-0.707	1.978	-0.701
N-乙酰天冬氨酸 N-Acetylaspartate	1.786	0.740	-	-	-	-	-	-	-	-
3-羟基丁酸 3-Hydroxybutyrate	-	-	0.979	-0.754	-	-	2.168	-0.855	2.4901	-0.879
二甲胺 Dimethylamine	-	-	2.363	0.797	-	-	-	-	-	-
甜菜碱 Betaine	-	-	-	-	0.538	0.742	-	-	-	-

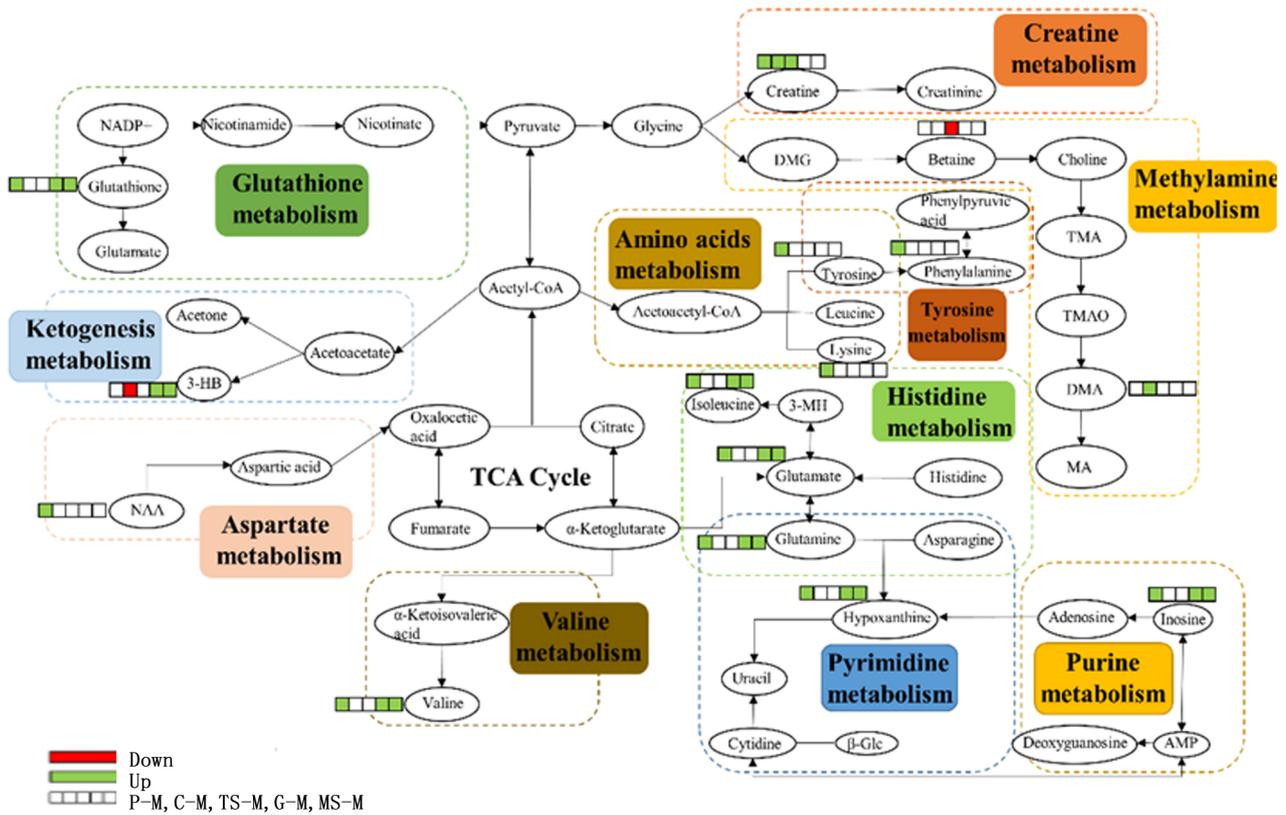
4 讨论

由于 WD 肝损伤是铜代谢障碍引起的,故其研究思路可能不同于其他肝纤维化的研究。目前,针对 WD 肝损伤较为常用的治疗方法是排铜(针对病因治疗)、保肝降酶及中药治疗,故实验分组在模型组、对照组的基础上,选用排铜药组(青霉胺)、保肝降酶药组(谷胱甘肽)、中药组(肝豆灵),同时前期研究发现铜负荷大鼠模型组存在 p38MAPK 蛋白的异常表达^[4],故进行 p38MAPK 的特异阻断剂 SB203580 干预治疗,分析青霉胺、谷胱甘肽、肝豆灵、SB203580 不同干预方法对 WD 铜负荷大鼠肝脏组织小分子代谢物的影响。

大鼠肝组织病理结果发现: WD 铜负荷大鼠模型发生明显纤维化改变,不同方法干预后,肝纤维化

得到不同程度减轻,说明不论从排铜、保肝、信号通路,还是从中医药角度干预,都可从病理上改善 WD 铜负荷大鼠模型肝损伤程度。WD 铜负荷大鼠模型肝脏发现了以下小分子代谢物的变化: 酮体代谢含量升高,肌酸含量下降。青霉胺干预后: 谷胱甘肽、天冬氨酸盐、肌酸、氨基酸、缬氨酸、酪氨酸、组氨酸、嘧啶、嘌呤含量上升; 肝豆灵加阻断剂组: 肌酸上升,甲胺下降; 谷胱甘肽干预后: 谷胱甘肽、缬氨酸、组氨酸、嘧啶、嘌呤含量上升; SB203580 组: 谷胱甘肽、缬氨酸、组氨酸、嘧啶、嘌呤含量上升。说明以上不同干预方法通过影响不同的代谢网络改善 WD 铜负荷大鼠模型肝损伤。

铜在体内的毒性主要是由于其所产生的一系列氧化还原反应而导致。WD 铜负荷大鼠肝脏中酮体



P-M: 青霉胺组 VS 模型组; C-M: 对照组 VS 模型组; TS-M: 肝豆灵 + SB203580 组 VS 模型组; G-M: 谷胱甘肽组 VS 模型组; S-M: SB203580 组 VS 模型组; 绿色、红色和无色分别代表代谢物水平相比模型组显著升高、降低和无显著性差异; 各虚线框代表不同的代谢通路。
 P-M: penicillamine group vs. model group; C-M: control group vs. model group; TS-M: GDL + SB203580 group vs. model group; G-M: glutathione group vs. model group; S-M: SB203580 group vs. model group; the levels of metabolites shown in green, red and white were significantly higher, lower and with no significant difference compared with the model group respectively. Each dotted box indicates a different metabolic pathway.

图 4 不同干预组大鼠肝脏的代谢通路图
 Fig. 4 Metabolic pathway map of rat liver in different intervention groups

代谢增强,与肝损伤过程中脂肪酸氧化增强有关,可能导致脂类物质的升高、胆碱向脂类的代谢加强^[5]。

肌酸是由精氨酸、甘氨酸及甲硫氨酸 3 种氨基酸所合成的物质,是目前评估肝损伤的一个重要代谢指标^[6]。实验中青霉胺组、肝豆灵加阻断剂组、谷胱甘肽组、阻断剂组氨基酸含量较铜负荷大鼠模型组明显升高,说明以上药物干预可调节 WD 铜负荷大鼠肝脏氨基酸代谢,修复肝脏损伤。

谷胱甘肽为解除毒素的特效物质,在 WD 解毒排酮、清除自由基方面发挥重要作用,研究发现谷胱甘肽胆汁外排是生成非胆汁酸依赖型胆汁流重要的驱动力^[7]。本实验中青霉胺组、谷胱甘肽组、阻断剂组谷胱甘肽含量较模型均明显升高,说明以上药物干预治疗能够上调 WD 肝纤维化铜负荷大鼠谷胱甘肽浓度,影响胆汁内铜的排泄及铜沉积引起的氧

化应激反应,从而对肝功能及肝纤维化有一定的改善作用^[7-8]。

嘌呤和嘧啶的衍生物碱基是核酸、核苷、核苷酸的成分,研究表明与嘧啶核苷酸代谢影响大鼠肝再生^[9]。本研究中青霉胺组、谷胱甘肽组、阻断剂组嘌呤和嘧啶含量较模型均明显升高,说明以上药物干预治疗能够上调 WD 铜负荷大鼠嘌呤和嘧啶浓度,对 WD 肝纤维化铜负荷大鼠肝再生、能量合成和糖、脂肪及蛋白质等重要物质代谢中起重要调节作用。

通过分析西药、中药、阻断剂不同干预方法对 WD 铜负荷大鼠肝脏组织小分子代谢物的影响,发现青霉胺组、谷胱甘肽组、SB203580 肝豆灵组、SB203580 组对 WD 铜负荷大鼠肝脏代谢网络影响较显著,代谢物的变化可能涉及谷胱甘肽代谢、肌酸代谢、酮体代谢、氨基酸代谢、嘧啶代谢、嘌呤代谢,

并有调节以上小分子物质代谢紊乱的作用,希望为今后中西医干预 WD 肝损伤的机制提供一些参考。但本研究发现中药肝豆灵对肝脏代谢网络干预作用较小,与前期研究结果不一致^[10],可能与样本量少存在偏倚有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Cheng N, Wang K, Hu W, et al. Wilson Disease in the South Chinese Han population [J]. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2014, 41(3): 363–367.
- [2] 刘霞,王映红. 基于 NMR 的代谢组学技术在药用植物研究中的应用 [J]. *药学学报*, 2017, 52(4): 541–549.
Liu X, Wang YH. The application of NMR-based metabolomics technique to medicinal plants [J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(4): 541–549.
- [3] Xu J, Jiang H, Li J, et al. ^1H NMR-based metabolomics investigation of copper-laden rat: a model of Wilson's disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119654.
- [4] 张娟,鲍远程,谢道俊,等. 通腑利尿、化痰散结方对铜负荷大鼠肝纤维化 p38MAPK 信号通路的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2012, 24(3): 280–282.
Zhang J, Bao YC, Xie DJ, et al. Study the effect of catharsis and diuresis, expelling stasis and mass recipe on liver fibrosis in copper-loaded rats by p38MAPK signaling pathway [J]. *Journal of Clinical Medicine of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 24(3): 280–282.
- [5] Gao H, Dong B, Liu X, et al. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: High-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 624(2): 269–277.
- [6] Longo N, Ardon O, Vanzo R, et al. Disorders of creatine transport and metabolism [J]. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2011, 157(1): 72–78.
- [7] Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1992, 263(5): G617–G624.
- [8] 张雷,戴一菲. 阿德福韦酯联合还原型谷胱甘肽对代偿期乙型肝炎后肝硬化患者肝功能和炎性因子水平的影响及其疗效分析 [J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(2): 194–196.
Zhang L, Dai YF. Effect of adefovir dipivoxil combined with reduced glutathione on liver function and inflammatory factor levels of patients with compensated posthepatic cirrhosis [J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2015, 21(2): 194–196.
- [9] 王撒,房连聪,袁美玲,等. 大鼠再生肝 8 种细胞的嘧啶核苷酸代谢相关基因转录谱预示的生理活动 [J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(1): 191–194.
Wang S, Fang LC, Yuan ML, et al. Physiological activities predicted by gene transcripts related to pyrimidine nucleotides metabolism in 8 kinds of regenerated rat liver cells [J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(1): 191–194.
- [10] 张娟,鲍远程,谢道俊,等. 肝豆灵对铜负荷大鼠肝纤维化血清代谢组学的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(3): 232–237.
Zhang J, Bao YC, Xie DJ, et al. Effect of Gandouling on serum metabolomics of liver fibrosis in copper-loaded rats [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 55(3): 232–237.

(收稿日期: 2019-06-30)