

• 研究论文 •

## 硫酸氧钒毒性的核磁共振代谢组学方法研究

董继扬<sup>a</sup> 危阳洋<sup>a,b</sup> 戴晓侠<sup>b</sup> 邓伶俐<sup>a</sup> 陈忠<sup>\*,a,b</sup>

(<sup>a</sup>厦门大学物理系 固体表面物理化学国家重点实验室 厦门 361005)

(<sup>b</sup>厦门大学生物材料系 厦门 361005)

**摘要** 采用基于核磁共振(NMR)的代谢组学方法,结合生化指标分析及组织病理学检测,研究了具有类胰岛素活性的硫酸氧钒(VOSO<sub>4</sub>)对 Wistar 大鼠的毒性作用.通过不同剂量的 VOSO<sub>4</sub>对 Wistar 大鼠连续灌胃给药 16 d,收集大鼠的血清和尿液,并采集样品的 <sup>1</sup>H NMR 谱进行多变量数据统计分析来辨识其特征代谢物,然后采用 TICL (a web Tool for automatic Interpretation of Compound List)方法建立特征代谢物的代谢网络模型,分析受影响的主要代谢途径及其相互关系.研究表明:高剂量组(45 mg/kg)和低剂量组(15 mg/kg)的特征代谢物含量与对照组存在明显的差异;与对照组相比,高剂量和低剂量组血清中乳酸、肌氨酸酐以及牛磺酸等代谢物的含量增加,尿液中氧化三甲胺(TMAO)、肌酐、牛磺酸和甘氨酸等代谢物的含量增加,并呈现显著的剂量依赖关系;给药组中乙酸和琥珀酸的含量都降低.这些结果说明 VOSO<sub>4</sub>可能影响大鼠体内的糖代谢、脂类代谢及肠道菌群代谢等多个代谢系统,高剂量的 VOSO<sub>4</sub>会导致肝脏毒性和肾脏损伤.

**关键词** 核磁共振(NMR); 代谢组学; 毒性; 硫酸氧钒; 化合物集合自动解释网络工具(TICL)

## Toxicity Study of VOSO<sub>4</sub> Using NMR-based Metabonomics

Dong, Jiyang<sup>a</sup> Wei, Yangyang<sup>a,b</sup> Dai, Xiaoxia<sup>b</sup>

Deng, Lingli<sup>a</sup> Chen, Zhong<sup>\*,a,b</sup>

(<sup>a</sup> State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Department of Physics, Xiamen University, Xiamen 361005)

(<sup>b</sup> Department of Biomaterials, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** NMR-Based metabonomics combined with clinical biochemical analysis and histopathological examination was applied to investigate the toxicity effects of vanadyl sulfate with insulin-like activity in male Wistar rats. Male Wistar rats were administrated with VOSO<sub>4</sub> at doses of 15 and 45 mg/kg body weight by intragastric administration for 16 d. Urine and serum samples were collected and analyzed by <sup>1</sup>H NMR experiment. Multivariate analyses were employed to identify the characteristic metabolites for the toxicity effects of vanadyl sulfate. Then the metabolic networks of these characteristic metabolites were built up using TICL (a web Tool for automatic Interpretation of Compound List). The relationship between the characteristic metabolites and the main metabolic pathways perturbed were analyzed and discussed. The differences of metabolic profiles were examined among high-dose (45 mg/kg), low-dose (15 mg/kg) of VOSO<sub>4</sub> and control groups. Compared to the control group, increased levels of lactate, creatinine and taurine in serum and increased excretion of trimethylamine-N<sub>2</sub>-oxide, creatinine, taurine and glycine in urine were found in both high- and low-dose groups which showed an obvious dose-dependent relationship. On the other hand, the concentration of acetate and succinate were decreased in both serum and urine samples of dosed groups. These results indicate that VOSO<sub>4</sub> have disturbed the carbohydrate metabolism, lipid metabolism and gut microflora and the high-dosage of VOSO<sub>4</sub> may cause liver and kidney injury.

\* E-mail: chenz@xmu.edu.cn

Received October 21, 2009; revised March 2, 2010; accepted April 18, 2010.

卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划(No. WKJ2008-2-36)和福建省自然科学基金(No. 2009J01299)资助项目.

**Keywords** nuclear magnetic resonance (NMR); metabonomics; toxicity; vanadyl sulfate; a web tool for automatic interpretation of compound list (TICL)

糖尿病已经成为继肿瘤、心血管疾病之后严重威胁人类健康的第三大疾病。大量临床资料显示: 对血糖的良好控制可以延缓糖尿病进程, 延缓各种糖尿病并发症的发病<sup>[1,2]</sup>。为此, 开发理想的降糖药物对于糖尿病的控制及临床干预具有重要的意义。钒化合物具有显著降糖作用, 有望成为干预糖尿病的理想药物, 具有广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。硫酸氧钒(VOSO<sub>4</sub>)是一种具有良好降糖作用的无机钒化合物, 但由于其具有较大的毒性<sup>[4,5]</sup>, 影响了临床上的应用, 因此从毒理学角度系统地研究 VOSO<sub>4</sub> 对机体的影响, 对这类钒化合物降糖药物的研究和开发具有重要的意义。

近年来, 代谢组学作为一门新兴的学科受到了包括疾病诊断、新药开发、药物毒理等领域研究者的广泛关注<sup>[6-12]</sup>。代谢组学旨在定量地描述生物体内源性代谢物的整体及其对内因和外因变化应答规律<sup>[13]</sup>, 它强调系统地、整体地分析生物体代谢表型动态变化<sup>[14]</sup>。利用代谢组学方法研究药物毒性, 不仅能揭示药物毒性作用的靶器官及其损伤程度, 而且还能监测药物毒性的早期生物效应, 具有明显的优势<sup>[15,16]</sup>。

核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)以其无创性、无偏向性及高通量等优点成为代谢组学的最主要分析手段之一。我们应用基于 NMR 的代谢组学方法, 考察不同剂量 VOSO<sub>4</sub> 作用下大鼠代谢表型差异, 探索与 VOSO<sub>4</sub> 毒性作用相关的特征代谢物, 并结合生化指标和组织病理学观察, 研究 VOSO<sub>4</sub> 在大鼠体内的生物效应。此外, 我们还采用 TICL (a web Tool for automatic Interpretation of Compound List)方法, 建立了受 VOSO<sub>4</sub> 作用干扰显著的代谢子网络模型, 分析 VOSO<sub>4</sub> 毒性的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物实验和样品收集

动物实验在厦门大学动物实验中心进行。采用厦门大学动物实验中心提供的 15 只雄性 Wistar 大鼠(体重 200~250 g), 同批饲养 7 d 之后, 按体重随机分为 3 组, 即: 对照组、低剂量组(15 mg/kg VOSO<sub>4</sub>)和高剂量组(45 mg/kg VOSO<sub>4</sub>), 每组 5 只。VOSO<sub>4</sub>(购自 Sigma 公司)用 0.9%的生理盐水稀释, 每天灌胃给药, 连续给药 16 d; 对照组则用 0.9%的生理盐水灌胃。饲养室光照 12 h, 黑暗 12 h, 室温(25±3) °C, 相对湿度 50%±10%, 并让动

物自由摄食饮水。

VOSO<sub>4</sub>给药 16 d 后, 用代谢笼收集各组大鼠的 24 h 尿液(加 1% NaN<sub>3</sub>水溶液作为防腐剂)。尿样经离心(6000 r/min, 4 °C 下离心 10 min)后取上清液, 置于-20 °C 冰箱保存, 直至 NMR 实验。动物实验结束时, 处死大鼠, 取血液、肝脏和肾脏组织。收集血液样品时, 采用抗凝管与非抗凝管分别收集大鼠血液。取非抗凝管中血液样品(没有加抗凝剂)经离心(6000 r/min, 4 °C 下离心 15 min)后取上层血清, 置于-80 °C 冰箱中保存, 直至 NMR 实验。取抗凝管中的血液样品做血浆生化指标分析之用。肝肾脏组织则用于组织病理切片观察。

### 1.2 血浆生化指标分析和肝肾的组织病理学检查

采用日立 7170 全自动生化分析仪测定血浆中的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素(UREA)、肌酐(CRE)和尿酸(UA)等生化指标。测定大鼠的肝脏和肾脏的重量, 分别计算肝脏和肾脏指数[指数/%=(肝重, 肾重/体重)×100%]。用社会科学统计软件包(Statistical Package for the Social Science, SPSS) V13.0 对各组结果进行统计分析。另外, 取部分肝脏和肾脏组织浸泡于 10%福尔马林中。经常规切片和 HE (hematoxylin-eosin) 染色后, 用显微镜进行组织病理学观察。

### 1.3 血清和尿液的核磁共振检测

配制尿液样品时, 取 400 μL 尿样, 加入 200 μL 磷酸缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.0, 99.9% D<sub>2</sub>O)混合, 以消除因 pH 变化所引起谱图化学位移漂移, 并加入 DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid) 作为化学位移内标。样品液移入 5 mm NMR 样品管。NMR 实验在 Varian NMR System 500 MHz 谱仪上进行。<sup>1</sup>H NMR 实验脉冲序列为采用预饱和和方式抑制水峰的标准一维脉冲序列。实验温度为 300 K, 谱宽 5000 Hz, 累加次数 128 次, 采样点数 5000。

配制血清样品时, 取 400 μL 血清加入 200 μL 磷酸缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4, 99.9% D<sub>2</sub>O)以消除 pH 变化导致谱图化学位移的偏差, 加入 DSS 作为化学位移内标。血清中同时含有大分子和小分子代谢物, 其常规 <sup>1</sup>H NMR 谱图较复杂。由于大分子具有较短的横向弛豫时间, 其谱线较宽, 因此小分子代谢物的信号往往被大分子宽的包络所掩盖, 难以进行指认和含量分析。为了方便谱峰解析, 需要对血清样品进行横向弛豫加权以过滤血清中大分子代谢物的信号。本文

采用一维 CPMG 序列<sup>[17]</sup>, 并用预饱和方式来抑制水峰. 实验温度 300 K, 谱宽 5000 Hz, 累加次数 128 次, 采样点数 4000.

#### 1.4 核磁共振谱图数据处理

利用 MestRe-C 2.3 软件(<http://qobru.euse.es/jsgroup/MestRe-C>)对 NMR 时间域上的自由感应衰减(FID)数据进行傅立叶变换、手动调相和基线校正等. 血清和尿液的 FID 数据均未尾充零至 8000, 再进行快速傅里叶变换, 傅里叶变换时不进行线性增宽. 用自编软件对谱图进行手工的谱峰对齐、分段积分、数据归一化等预处理. 其中, 血清样品分析  $\delta$  0.5~4.5 区间内的数据, 采用  $\Delta\delta=0.04$  的等间隔积分, 得到数据矩阵; 尿液样品分析  $\delta$  0.5~8.5 区间内的数据, 并去除残余水峰( $\delta$  4.6~5.0)和尿素峰( $\delta$  5.5~6.2), 采用  $\Delta\delta=0.04$  的等间隔积分, 得到数据矩阵. 多元统计分析之前, 先采用面归一(constant sum)和中心化(mean-centering)方法分别对矩阵的行和列进行预处理.

## 2 常规的毒性评价

我们先采用动物外观观察、血液生化指标分析以及组织病理切片观察等传统方法对 VOSO<sub>4</sub> 的毒性进行评价. 首先, 从动物实验中可观察到 VOSO<sub>4</sub> 给药组的大鼠从第 4 d 起便陆续出现不同程度的腹泻、毛色干枯、活动减少等中毒特征, 并且体重增加率显著下降. 这表明 VOSO<sub>4</sub> 已经开始对肠胃产生了影响. 其次, 给药 16 d 后, 对三个分组大鼠的血浆分别进行生化指标分析, 结果如表 1 所示(VOSO<sub>4</sub> 的降糖作用已有文献讨论<sup>[18]</sup>, 由于本文主要研究 VOSO<sub>4</sub> 的毒性效应, 因此表 1 中未给出血糖的数据).

对各项指标进行单变量 *t* 检验, 发现给药组中 CRE 的含量显著升高, 血液中 CRE 含量的升高表明可能导致了肾脏损伤. 高剂量组的 UA 也有一定程度的增高, 说明了 VOSO<sub>4</sub> 可能引起大鼠肾毒性. 此外, 高剂量组的 AST 相对于正常组升高了约 20%, 表明可能已导致大鼠的肝脏毒性. 血浆的生化检测结果在一定程度上说明了高剂量的 VOSO<sub>4</sub> 可能导致了一定肝脏和肾脏毒性.

此外, 对各剂量组与对照组进行肝脏和肾脏的组织病理学检查, 均未观察到明显病理特征改变(病理切片图未给出). 这说明了 VOSO<sub>4</sub> 给药后并未导致实质性的肝脏和肾脏毒理损伤. 这可能是由于 VOSO<sub>4</sub> 先引起肝脏和肾脏分子代谢层面的变化, 暂时还没有导致组织的病理学改变, 因此是药物毒性的早期表现.

综上所述, 常规的毒理评价方法不能提供全面的分子生物学信息, 对药物毒性早期生物效应的监测不够灵敏, 更无法从整体的、网络的角度解释药物毒性的作用机制. 这与生物体代谢系统的网络特性不相符, 说明了传统毒理评价方法具有一定的局限性.

## 3 基于 NMR 的代谢组学方法评价

为了进一步研究 VOSO<sub>4</sub> 的毒性及其作用机理, 我们采用基于 NMR 的代谢组学方法, 对大鼠血清和尿液中的小分子代谢物进行分析. 分别采集给药 16 d 后对照组、低剂量组和高剂量组大鼠的尿液和血清样品, 获得其 <sup>1</sup>H NMR 的波谱信息, 然后利用多元统计方法分析 VOSO<sub>4</sub> 所导致的内源性代谢产物的改变, 以此进一步研究 VOSO<sub>4</sub> 的毒性机制. 其中, 尿液样品 NMR 谱的初步分析结果已在 BMEI2008 会议中报道, 见文献[15].

表 1 各实验组大鼠的相关生化参数

Table 1 Physiological and biochemical parameters of the rats

Parameter	Control	VOSO <sub>4</sub>	
		15 mg/kg	45 mg/kg
Rate of body weight gained/%	22.6 ± 1.1	16.6 ± 1.8**	9.6 ± 7.1**
Liver index/%	2.72 ± 0.14	2.80 ± 0.14	3.01 ± 0.28
Renal index/%	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.02
ALT/(U·L <sup>-1</sup> )	34.1 ± 8.9	28.8 ± 2.5	35.2 ± 6.8
AST/(U·L <sup>-1</sup> )	115.0 ± 8.4	107.9 ± 14.7	137.7 ± 28.6
TP/(g·L <sup>-1</sup> )	76.9 ± 0.1	73.2 ± 1.3	73.6 ± 3.8
ALB/(g·L <sup>-1</sup> )	35.8 ± 0.6	35.5 ± 0.3	35.2 ± 0.7
ALP/(U·L <sup>-1</sup> )	170.5 ± 14.8	146.6 ± 10.9	175.7 ± 14.7
UREA/(mmol·L <sup>-1</sup> )	6.4 ± 0.1	5.8 ± 0.4	5.9 ± 0.5
CRE/(μmol·L <sup>-1</sup> )	65.2 ± 6.4	84.2 ± 4.8**	76.4 ± 8.6*
UA/(μmol·L <sup>-1</sup> )	131.5 ± 26.2	124.0 ± 22.5	152.8 ± 34.0

Values are expressed as means ± SD (*n* = 5); \*: *p* < 0.05 for significant difference from control group; \*\*: *p* < 0.001 for significant difference from control group.

### 3.1 大鼠尿液 $^1\text{H}$ NMR 谱的 PCA 分析

对大鼠尿液的  $^1\text{H}$  NMR 谱进行主成分分析(PCA), 结果如图 1 所示. 从图中可见, 低剂量组(15 mg/kg  $\text{VOSO}_4$ )和高剂量组(45 mg/kg  $\text{VOSO}_4$ )均与对照组有明显的差异, 而且这种差异具有一定的剂量依赖性.

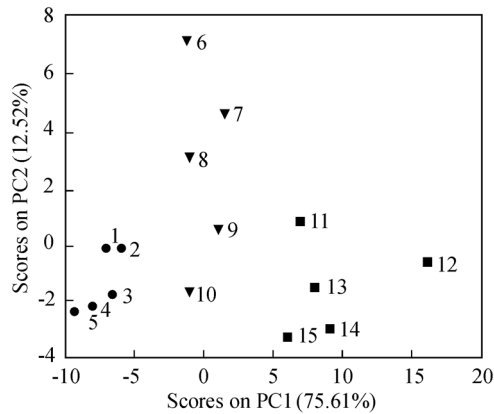


图 1 各实验组大鼠尿液的  $^1\text{H}$  NMR 谱的 PCA 得分图

Figure 1 PCA score plots derived from  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine samples

Control (■), 15 mg/kg body weight  $\text{VOSO}_4$ -treated (▼), and 45 mg/kg body weight  $\text{VOSO}_4$ -treated (●) groups

进一步分析可得: 引起不同组样本分布差异的特征代谢物如表 2 所示. 与对照组相比, 随着给药剂量的升高, 大鼠尿液中丙氨酸、氧化三甲胺(trimethylamine-

表 2 各剂量组大鼠尿液中代谢物的变化<sup>a</sup>

Table 2 Assessment of metabolites in urine from different  $\text{VOSO}_4$ -treated rats

Metabolite	Chemical shift ( $\delta$ ) and multiplicity	$\text{VOSO}_4$ group	
		15 mg/kg	45 mg/kg
Lactate	1.33 (d), 4.12(q)	↑	—
Alanine	1.48 (d)	↑↑	↑
Acetate	1.93 (s)	↓	↓↓
Succinate	2.42 (s)	↓	↓
Glycoprotein	2.04(s)	↑	↑↑
DMA	2.70 (s)	↑	↑↑
DMG	2.98 (s)	↑	↑
Creatinine	4.05 (s), 3.05 (s)	↑	↑↑
TMAO	3.26 (s)	↑	↑↑
Taurine	3.43 (t), 3.26 (t)	↑	↑↑
Glycine	3.57 (s)	↑	↑↑
Glucose	3.5~4.0 (m)	↑	↑↑
Phenylalanine	7.35 (m), 7.42 (m)	—	↑
Hippurate	7.73 (d), 7.64 (t), 7.55 (t)	—	↑

<sup>a</sup> Abbreviations and keys: s, singlet; d, double; t, triplet; m, complex multiplet. —, not detectably different from control level; ↑, detectable elevation from control levels; ↓, detectable reduction from the control levels; ↑↑, obviously elevation from control levels; and ↓↓, obviously reduction from control levels.

*N*-oxide, TMAO)、牛磺酸、肌酸酐、二甲胺(dimethylamine, DMA)、二甲甘氨酸(dimethylglycine, DMG)、马尿酸、苯丙氨酸和乳酸显示出不同程度的升高, 而琥珀酸和乙酸显示出一定程度的降低.

### 3.2 大鼠血清 $^1\text{H}$ NMR 谱的 PCA 分析

对大鼠血清  $^1\text{H}$  NMR 谱进行 PCA 分析的结果如图 2 所示. 其中, 高剂量组中编号为 11 的样本点偏离其他样本较远. 查看谱图发现, 11 号样本的信噪比较差, 可能是样品比较稀引起的. 将所有样本作为一个集合进行统计检验, 发现 11 号样本处于 95%置信区间内, 不能当作离群点处理, 而且考虑到样本数较少, 仍保留此样本.

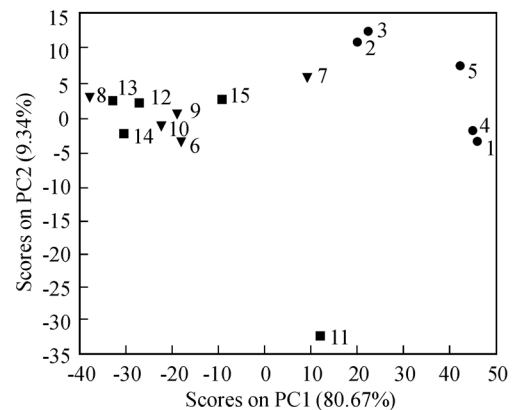


图 2 各实验组大鼠血清的  $^1\text{H}$  NMR 谱的 PCA 得分图

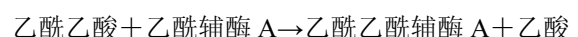
Figure 2 PCA score plots derived from  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum samples

Control (●), 15 mg/kg body weight  $\text{VOSO}_4$ -treated (▼), and 45 mg/kg body weight  $\text{VOSO}_4$ -treated (■) groups

图 2 表明对照组和给药组具有比较明显的差异, 这表明了给药组的内源性代谢发生了明显的改变. 但给药组中  $\text{VOSO}_4$  不同剂量组之间的区分并不明显. 对 PCA 负载图中偏离中心点较远的代谢物做进一步的统计分析后发现, 除了血糖明显降低外, 给药组血清中乳酸、肌酸酐、牛磺酸含量均具有升高的趋势, 尤其乳酸浓度的升高最为明显, 而乙酸和琥珀酸含量则有所下降. 这些结果与尿液分析结果基本吻合, 这从另一角度说明了血清和尿液中的代谢产物具有很好的相关性.

### 3.3 结果讨论

综合血清和尿液的 NMR 代谢组学的分析结果可见,  $\text{VOSO}_4$  导致血清和尿液中乳酸的含量显著升高, 而乙酸的含量显著下降. 由于乳酸是参与能量代谢和糖酵解过程的主要代谢物, 它的增高表明柠檬酸循环的降低和无氧代谢的增强, 说明机体无氧代谢可能发生了紊乱<sup>[19,20]</sup>. 乙酸则是短链脂肪酸氧化的产物, 即:



乙酸含量的显著变化表明在肝线粒体中进行的脂肪代谢可能出现了紊乱<sup>[21~23]</sup>.

在大鼠尿液中,低剂量给药组中 TMAO, DMA, DMG 等代谢物的含量升高,这些代谢物是肾乳头受损的主要标志物<sup>[24]</sup>.在高剂量组中 TMAO 和 DMG 的含量进一步上升,表明随着 VOSO<sub>4</sub> 给药量增加,其对肾乳头的毒性逐渐加深.另外,给药组大鼠尿液中葡萄糖和氨基酸(如甘氨酸和丙氨酸)的含量也升高,这意味着肾小管对低分子化合物重吸收的能力降低,是一个典型的近曲小管非特异性损伤标志<sup>[25]</sup>.值得注意的是:在各给药组中血液中葡萄糖的含量都有明显的降低,而尿液的葡萄糖含量却反而升高,这可能是由于 VOSO<sub>4</sub> 导致肾脏的损伤,造成了肾小管对葡萄糖重吸收能力的降低所致.生化指标分析与 NMR 代谢组学分析均发现血液中肌酐的含量有比较明显的增高.由于血液中肌酐含量取决于肾脏的排泄能力,其含量的增加表明肾功能不足,因此血肌酐含量是衡量肾功能的一个主要指标.这些结果表明:虽然 VOSO<sub>4</sub> 对肾脏已产生了毒性损伤,但是肾脏的组织病理检测却没有发现明显的组织病变.这说明了 VOSO<sub>4</sub> 造成的肾脏损伤还未出现实质的病变,可能是由于肾脏毒性程度较轻的缘故.

根据 Jaeschke 等<sup>[26]</sup>的研究,尿液中牛磺酸的含量增多是肝脏损伤的一个重要指标.动物体内的胆汁酸是甘氨酸和牛磺酸的结合物,也是胆汁的主要成分.肝脏中胆汁酸浓度过高(如胆汁淤积)对肝脏具有不同程度的损害作用,并导致牛磺酸经肾脏排泄量增加<sup>[27]</sup>.肌酐是在肝脏中合成和代谢,入血后被外周组织利用,最后经肾脏排出,有文献报道尿液中肌酐含量的升高是肝损伤的一个标志<sup>[28]</sup>.在高剂量组中,随着剂量的升高,牛磺酸和肌酐的含量进一步升高,说明了随着 VOSO<sub>4</sub> 给药的增多,其对肝脏的损伤进一步加剧.

尿液中的马尿酸和苯丙氨酸主要是肠道微生物代谢的产物<sup>[29]</sup>,它们的增加可能是由于肠道微生物环境改变引起的<sup>[30]</sup>.例如强烈或者持久的蠕动和分泌活动破坏了机体对内环境的控制作用,导致胃肠道代谢系统紊乱.这也进一步表明了 VOSO<sub>4</sub> 对胃肠道的毒性作用.

#### 4 基于特征代谢物的代谢子网络模型分析

通过对代谢轮廓的分析,可以挖掘出实验组和对照组之间具有统计差异性的内源性代谢产物.然而,仅仅找出这些特征的代谢产物还远远不够,如何解读这些特征代谢物的生物学功能,寻找受扰动的生物代谢网络及其作用机制,才是代谢组学研究的关键.生物机体的代谢是一个极其复杂的系统,代谢组之间通过众多的反应

相互联系构成复杂而庞大的代谢网络,同时它们又处于对内部和外部众多因素不断地动态响应之中,因而对这些特征代谢物的代谢网络和代谢机制的研究变得很困难,也是代谢组学研究的难点所在.

TICL<sup>[31]</sup> (<http://mips.helmholtz-muenchen.edu/proj/cmp/>) 是一个对代谢物(化合物)列表进行自动解释的网络工具.它不仅提供了对代谢物之间的关系建立代谢网络模型,还对该模型进行定量的分析,是代谢组学研究中的一个非常有用的工具,它为特征性代谢物的代谢网络和代谢机制的研究提供了一个新的视角.将 TICL 应用于本研究项目中,综合血清和尿液 NMR 谱中发现的 13 种特征代谢物(糖蛋白是一类物质,而不是一个特定的代谢物,需排除),将其输入 TICL 中. TICL 可返回 8 个“富集子网络”模型,如表 3 所示.

**表 3** 输入 VOSO<sub>4</sub> 给药组和控制组显著增加或降低的 13 种化合物后, TICL 返回的“富集子网络”定量分析报告

**Table 3** Quantitative report “Enriched subnetworks” returned by TICL after the submission of 13 compounds with significantly increased or decreased levels between control and VOSO<sub>4</sub>-treated rats

Model	Maximum distance	Number of input compounds	pValue
Model 1	1	2	<0.14
Model 2	2	6	<0.01
Model 3	3	11	<0.01
Model 4	4	12	<0.01
Model 5	5	13	<0.01
Model 6	6	13	<0.01
Model 7	7	13	<0.01
Model 8	8	13	<0.01

我们以模型 3(也表示为模型 D<sub>3</sub>)的代谢子网络(图 3)为例说明 TICL 所返回的报表中各个项目的含义.代谢子网络以化合物为节点,每个模型所包含化合物的数量、种类不同.如模型 3 子网络包含 24 种化合物,这些化合物有些是输入的特征代谢物(模型 3 中包含 11 种输入的特征代谢物).最大距离(Maximum distance)表示输入特征代谢物之间的最大节点数,也就是在代谢系统中一种特征代谢物通过化学反应生成另一种特征代谢物所需要的最少步骤数.如模型 1 中的最大距离为 1,表明两种化合物之间是底物与产物的关系,一步反应就可得到.如果最大距离为 2,表示最多需两步反应,依次类推.若用 *p* 值表示这个代谢子网络模型的可信度,则 *p* 值越小可信度越高<sup>[31]</sup>.

通常可以选一个包含输入特征代谢物数量多、最大距离小、同时 *p* 值小的子网络模型进行深入分析.如表

3 中的模型 3, 该代谢子网络模型中包含了  $VOSO_4$  给药后引起机体内显著变化 11 种特征代谢物, 其中任意两种代谢物之间反应的最大距离为 3, 且该模型的可信度大于 99%, 如图 3 所示.

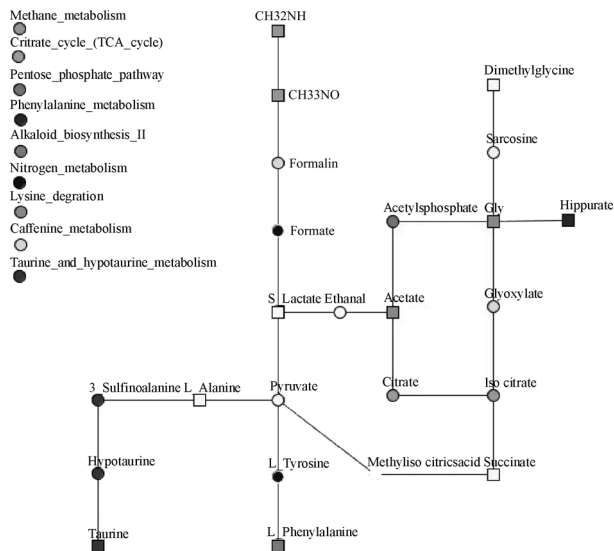


图 3 表 3 中模型 3 的代谢子网络示意图

Figure 3 Visualization of the inferred network of model D<sub>3</sub> mentioned in Table 3

Boxes are compounds from the input list, and circles are intermediate compounds. Colors are used to specify canonical KEGG metabolic pathways

对图 3 代谢子网络进行分析的结果见表 4 所示. 即  $VOSO_4$  给药组中甲胺代谢、牛磺酸和亚磺磺酸代谢、生物碱合成、赖氨酸降解、苯丙氨酸代谢、三羧酸循环等代谢系统受到了影响.

表 4 给药组中大鼠体内主要受扰动的代谢途径

Table 4 Summary of metabolic pathways perturbed of  $VOSO_4$ -treated rats from model D3 from TICL<sup>a</sup>

Metabolic pathway	Main metabolite	Change
Methane metabolism	DMA, TMAO	↑
Taurine and hypotaurine metabolism	Taurine	↑
Alkaloid biosynthesis II	Phenylalanine	↑
Lysine degradation	Glycine, Acetate	—
Phenylalanine metabolism	Hippurate	↑
Citrate cycle	Succinate	↓

<sup>a</sup> Abbreviations and keys: ↑, elevation from control levels; ↓, reduction from the control levels; —, no apparent tendency from control level; DMA, dimethylamine; and TMAO, trimethyl-N-oxide.

表 4 中 DMA 和 TMAO 含量的升高表明给药组中甲胺代谢受到了影响. 甲胺的产生是通过食物中摄入的胆碱通过降解生成三甲胺, 而且它的二甲胺和单胺代谢物是通过肠道细菌的代谢产生的. 甲胺是一类重要的渗透

压调节化合物, 甲胺代谢的紊乱将可能导致体内渗透压调节失衡<sup>[23]</sup>. 牛磺酸的升高通常表明牛磺酸和亚磺磺酸代谢受到干扰, 尿液中牛磺酸代谢产物特别是牛磺酸的升高很有可能源于肝脏损伤. 苯丙氨酸是生物碱合成代谢的产物, 苯丙氨酸含量的升高说明由于  $VOSO_4$  给药使体内生物碱合成代谢受到了影响. 甘氨酸和乙酸代谢产物等属于赖氨酸降解代谢途径. 在赖氨酸降解的代谢途径中, 甘氨酸的含量升高而乙酸的含量降低, 可能是由于  $VOSO_4$  药物作用使此代谢途径中某种代谢的酶的活性发生了改变, 从而使一种代谢物(如甘氨酸)因为不断地积累而升高而另一种代谢物(如乙酸)因为不断地消耗而减少. 马尿酸是苯丙氨酸代谢的一个产物, 马尿酸含量的升高可能表明给药组中苯丙氨酸代谢受到了影响<sup>[32]</sup>. 同时马尿酸以及马尿酸的前体物质是由肠道菌群代谢所产生的, 肠道环境的改变可能导致了马尿酸的变化. 琥珀酸是三羧酸循环的一个重要中间代谢产物, 琥珀酸的降低表明三羧酸循环可能受到了影响<sup>[33]</sup>.

## 5 总结

应用基于 NMR 的代谢组学方法, 研究了  $VOSO_4$  灌胃对大鼠的毒性作用. 通过采集正常对照组、 $VOSO_4$  低剂量给药组和高剂量给药组的大鼠血清和尿液的 <sup>1</sup>H NMR 波谱, 进行多元统计分析, 获取相应的代谢系统差异信息. 同时结合 TICL 这一新的代谢网络分析方法, 建立受影响的代谢子网络模型, 以此分析  $VOSO_4$  对大鼠毒性的作用机理. 研究结果表明:  $VOSO_4$  不仅导致了胃肠道反应, 造成肝脏和肾脏等重要器官损伤, 而且还会对甲胺代谢、牛磺酸和亚磺磺酸代谢以及生物碱合成等多个代谢子系统产生了显著的影响.

与生化检测和组织病理学检测等传统的毒性评价方法相比, 基于 NMR 的代谢组学分析方法是从小整体上分析  $VOSO_4$  所产生的生物效应, 充分反应了代谢通路的网络关系, 比单一靶标方法具有更好的一致性和预见性, 因此更适合于药物毒理的研究. 其次, 基于 NMR 的代谢组学分析具有简单、快速、无创伤等特点, 样品(如血液尿液)易获得且处理方法简单, 在对重要器官的毒性和损伤的检测方面, 无需用创伤性比较大、且过程繁琐的组织病理学检测就能达到其检测目的. 另外, 利用 TICL 对代谢组学分析结果进行建模, 还可以得到一些受到显著影响的代谢子网络, 分析这些子网络可以帮助我们进一步探讨其外源刺激所导致代谢网络的变化及其作用机制, 从分子水平上来解释发生病理生理学改变的原因. 总之, 代谢组学的分析方法具有多种常规检验方法无法比拟的优势, 相信随着研究的不断深入, 代谢

组学技术在药物毒理机制信息和生物标志物的研究中将发挥越来越重要的作用。

## References

- 1 Beckman, J. A.; Creager, M. A.; Libby, P. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2570.
- 2 Stumvoll, M.; Goldstein, B. J.; Van Haeften, T. W. *Lancet* **2005**, *365*, 1333.
- 3 Pepato, M. T.; Magnani, M. R. T.; Kettelhut, I. C.; Brunetti, I. L. *Mol. Cell. Biochem.* **1999**, *198*, 157.
- 4 De La Torre, A.; Granero, S.; Mayayo, E.; Corbella, J.; Domingo, J. L. *Toxicol. Lett.* **1999**, *105*, 75.
- 5 Dabros, W.; Goc, A.; Turyna, B.; Kordowiak, A. M. *Pol. J. Pathol.* **2004**, *55*, 25.
- 6 Wei, L.; Liao, P.; Wu, H.; Li, X.; Pei, F.; Li, W.; Wu, Y. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2009**, *234*, 314.
- 7 Park, J. C.; Hong, Y. S.; Kim, Y. J.; Yang, J. Y.; Kim, E. Y.; Kwack, S. J.; Ryu, D. H.; Hwang, G. S.; Lee, B. M. *J. Toxicol. Environ. (Health-Part a-Current Issues)* **2009**, *72*, 374.
- 8 Brindle, J. T.; Antti, H.; Holmes, E.; Tranter, G.; Nicholson, J. K.; Bethell, H. W. L.; Clarke, S.; Schofield, P. M.; Mckilligin, E.; Mosedale, D. E.; Grainger, D. J. *Nat. Med. (N. Y.)* **2002**, *8*, 1439.
- 9 Robertson, D. G.; Reily, M. D.; Sigler, R. E.; Wells, D. F.; Paterson, D. A.; Braden, T. K. *Toxicol. Sci.* **2000**, *57*, 326.
- 10 Wang, Q. J.; Jiang, Y.; Wu, C. Q.; Zhao, J. Y.; Yu, S. Z.; Yuan, B. L.; Yan, X. Z.; Liao, M. Y. *Toxicol Appl. Pharm.* **2006**, *215*, 71.
- 11 Lu, Q.; Huang, Y. H.; Cong, H.; Liu, X.; Gao, H. C.; Lin, D. H.; Wang, H. M. *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, *37*, 194.
- 12 Liao, P. Q.; Wei, L.; Wu, H. F.; Li, W. S.; Wu, Y. J.; Li, X. J.; Ni, J. Z.; Pei, F. K. *J. Rare Earths* **2009**, *27*, 280.
- 13 Tang, H. R.; Wang, Y. L. *Prog. Biochem. Biophys.* **2006**, *33*, 401.
- 14 Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *Nature* **2008**, *455*, 1054.
- 15 Dai, X. X.; Dong, J. Y.; Chen, Z.; Zhang, Q. Q. *IEEE. Toxicity Study of Oral Vanadyl Sulfate by NMR-based Metabonomic*, Los Alamitos, IEEE Computer Soc., **2008**.
- 16 Xu, E. Y.; Schaefer, W. H.; Xu, Q. W. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12*, 40.
- 17 Lucas, L. H.; Larive, C. K.; Wilkinson, P. S.; Huhn, S. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 156.
- 18 Goldfine, A. B.; Patti, M. E.; Zuberi, L.; Goldstein, B. J.; Leblanc, R.; Landaker, E. J.; Jiang, Z. Y.; Willsky, G. R.; Kahn, C. R. *Metab.-Clin. Exp.* **2000**, *49*, 400.
- 19 Makinen, V. P.; Soininen, P.; Forsblom, C.; Parkkonen, M.; Ingman, P.; Kaski, K.; Groop, P. H.; Ala-Korpela, M.; Finndiane Study, G. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2006**, *19*, 281.
- 20 Xu, J. J.; Zhang, J.; Dong, J. Y.; Cai, S. H.; Yang, J. Y.; Chen, Z. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1657.
- 21 Sebedio, J. L.; Pujos-Guillot, E.; Ferrara, M. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2009**, *12*, 412.
- 22 Romick-Rosendale, L. E.; Goodpaster, A. M.; Hanwright, P. J.; Patel, N. B.; Wheeler, E. T.; Chona, D. L.; Kennedy, M. A. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, S36.
- 23 Salek, R. M.; Maguire, M. L.; Bentley, E.; Rubtsov, D. V.; Hough, T.; Cheeseman, M.; Nunez, D.; Sweatman, B. C.; Haselden, J. N.; Cox, R. D.; Connor, S. C.; Griffin, J. L. *Physiol. Genomics* **2007**, *29*, 99.
- 24 Williams, R. E.; Twomey, K.; Jacobsen, M.; Bandara, L.; Kennedy, S.; Lock, E. A. *Toxicology* **2003**, *192*, 77.
- 25 Ala-Korpela, M. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, *46*, 27.
- 26 Jaeschke, H.; Gores, G. J.; Cederbaum, A. I.; Hinson, J. A.; Pessayre, D.; Lemasters, J. J. *Toxicol. Sci.* **2002**, *65*, 166.
- 27 Holmes, E.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Connor, S. C.; Connelly, J. C.; Haselden, J. N.; Damment, S. J. P.; Spraul, M.; Neidig, P.; Nicholson, J. K. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 471.
- 28 Clayton, T. A.; Lindon, J. C.; Everett, J. R.; Charuel, C.; Hanton, G.; Le Net, J. L.; Provost, J. P.; Nicholson, J. K. *Arch. Toxicol.* **2004**, *78*, 86.
- 29 Delaney, J.; Neville, W. A.; Swain, A.; Miles, A.; Leonard, M. S.; Waterfield, C. J. *Biomarkers* **2004**, *9*, 271.
- 30 Waters, N. J.; Waterfield, C. J.; Farrant, R. D.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1448.
- 31 Antonov, A. V.; Dietmann, S.; Wong, P.; Mewesm, H. W. *FEBS J.* **2009**, *276*, 2084.
- 32 Daykin, C. A.; Van Duynhoven, J. P. M.; Groenewegen, A.; Dachtler, M.; Van Amelsvoort, J. M. M.; Mulder, T. P. J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1428.
- 33 Zhang, S. C.; Gowda, G. A. N.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Barbas, C.; Raftery, D. *Anal. Biochem.* **2008**, *383*, 76.

(A0910213 Zhao, C.; Zheng, G.)