

## · 论著 ·

## 基于 GC-MS 技术的金钱草干预结晶肾损伤小鼠血清代谢组学研究

杜毅<sup>1</sup>, 丁德英<sup>2</sup>, 吕磊<sup>3</sup>, 李玲<sup>2</sup> (1. 上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092; 2. 海军军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433; 3. 上海东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

**[摘要]** 目的 利用血清代谢组学方法监测结晶肾损伤相关的代谢变化, 评价金钱草提取物治疗结晶肾损伤的作用。方法 将 21 只野生型 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 空白对照组、结晶肾损伤模型组和金钱草干预组。采用乙酸盐诱导小鼠结晶肾损伤模型, 给予 6 d 相应的治疗后, 取小鼠血清进行气相色谱-质谱联用仪分析, 结合模式识别筛选模型组和对照组之间的差异代谢物, 并以此评价金钱草的治疗作用。结果 血清代谢组学分析鉴定了 14 种结晶肾损伤相关的生物标志物, 包括嘌呤代谢物、氨基酸代谢物、脂肪酸代谢物等, 同时数据显示金钱草提取物对结晶肾损伤有改善作用。结论 金钱草提取物能够通过调节失衡的嘌呤代谢、氨基酸代谢、糖代谢等途径而发挥预防和治疗结晶肾损伤作用。

**[关键词]** 结晶肾损伤; 金钱草; 气相色谱-质谱联用; 代谢组学

**[中图分类号]** R983 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)04-0332-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.009

Metabolomics study of *Lysimachiae Herba* on mice with crystallization kidney injury by GC-MS

DU Yi<sup>1</sup>, DING Deying<sup>2</sup>, LÜ Lei<sup>3</sup>, LI Ling<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Xinhua Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China; 2. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate therapeutic effects of *Lysimachiae Herba* for crystallization kidney injury with serum metabolomics method. **Methods** 21 rats were randomly divided into three groups including control group, crystallization kidney injury model group and *Lysimachiae Herba*-treated group. The medicated group received *Lysimachiae Herba* for 6 days. Then, the serum samples of each rat were collected and analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS). The pattern recognition analysis of metabolomics differences among three groups was used to evaluate therapeutic effects of *Lysimachiae Herba*. **Results** 14 metabolites were identified through serum metabolomics analysis. The possible mechanism of crystallization kidney injury was mainly related to the metabolic products of purine, amino acid, fatty acid and sugar. The kidney injury by crystallization was alleviated by *Lysimachiae Herba*. **Conclusion** *Lysimachiae Herba* has preventive and therapeutic effects for crystallization kidney injury through partially regulating the perturbed purine metabolism, amino acid metabolism and glycometabolism.

**[Key words]** kidney injury by crystallization; *Lysimachiae Herba*; GC-MS; metabolomics

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是指在各种慢性肾实质疾病的基础上缓慢地出现肾功能减退而至衰竭的一种慢性恶性疾病,其临床综合征包括肾功能减退,代谢产物潴留,水、电解质、酸碱平衡失调等全身各系统症状<sup>[1]</sup>。各种原发性和继发性的泌尿系统病变导致肾脏结构和功能破坏的疾病

都会引起肾衰,其中泌尿系统结石已经同高血压、糖尿病一起被公认为慢性肾病的危险因素<sup>[2]</sup>。肾结石主要成分为草酸钙和磷酸钙,主要的治疗手段是外科手术,其发病率高,治疗花费大,易诱发尿毒症。结晶是结石的早期表现,对于其成核、生长以及对小管上皮细胞损伤作用的机制仍缺乏深入了解。由此,对肾脏结晶所造成损伤的早期诊断与针对性治疗具有显著的临床价值。

金钱草为报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的新鲜或干燥全草,主要含黄酮类,苷类,鞣质,挥发油等成分,味甘、微苦、性凉,具

**[作者简介]** 杜毅, 学士, 主管药师, 研究方向: 制剂生产及研发, Email: dongyi02@xinhua.med.com.cn

**[通讯作者]** 李玲, 硕士, 实验师, 研究方向: 代谢组学研究, Email: 316262150@163.com

有利水通淋、清热利湿、散瘀消肿之功效<sup>[3]</sup>。大量的临床经验表明,金钱草具有利尿通淋,排除结石之功效,可用于结石的预防和治疗<sup>[4-5]</sup>,然而其作用机制尚不明确。代谢组学是对生物体内尽可能多的代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与机体生理病理变化的相互关系的一种研究方式<sup>[6]</sup>。它能够阐明机体的整体代谢状态,与中医药治疗的整体观念相符。本研究利用代谢组学方法探索与结晶肾损伤密切相关的潜在生物标志物,并以金钱草作为干预药物,探讨其对结晶肾损伤的预防治疗作用机制,为肾结石的早期诊断治疗及金钱草的进一步合理用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Thermo Trace GCUltra 气相色谱仪、DSQII 质谱仪、FRESCO17 台式冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific), METTLER AE240 型电子天平(瑞士梅特勒公司), DZG-6020 真空干燥箱(上海益恒实验仪器公司)。

### 1.2 试剂

丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、谷胱甘肽还原酶(GSH)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(南京建成生物工程公司),甲氧胺盐酸盐、吡啶、N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA)、三甲基氯硅烷(TMCS)、核糖醇(Sigma Aldrich 公司),甲醇为色谱纯(德国默克公司),氯仿为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),金钱草(产地:广西,批号:20171201)购于上海雷允上大药房。

### 1.3 实验动物

SPF 级野生型 C57BL/6 小鼠 21 只,体重 25~30 g,雄性,7~8 周龄,海军军医大学实验动物中心提供。小鼠饲养于保持 12 h/12 h 昼夜的房间中,给予标准饲料,恒温(21~23)℃,相对湿度为 40%左右,12 h 交替照明,21 只小鼠在上述条件下适应环境 24 h。

## 2 方法

### 2.1 动物模型的构建和治疗

将 21 只野生型 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:空白对照组、结晶肾损伤模型组和金钱草干预组,每组 7 只,24 h 适应性饲养后,对模型组和金钱草干预组分别每天腹腔注射乙醛酸盐 100 mg/kg,对照

组给予相同体积的生理盐水,连续注射 6 d。同时金钱草干预组每天灌胃给予相当于原药材 1 g/kg 剂量的金钱草提取物,连续给药 6 d,对照组和结晶模型组每天给予同体积的生理盐水,连续 6 d。

### 2.2 样品收集

按上述方法给药饲养后 6 d 后,小鼠眼眶取血,血样在室温下静置 45 min,1 500 ×g 离心 15 min,分离得到上层血清,置于一 80℃ 冷冻保存。处死全部小鼠,行心脏灌流,切取左侧肾脏取皮髓质交界处组织,检测钙含量、MDA、SOD、GSH、CAT 活力水平。

### 2.3 样品制备

将冻存的血清样品置于室温自然解冻,取血清 100 μl,加入 400 μl 甲醇(含 10 μg/ml 的核糖醇内标),涡旋 1 min,4℃ 静置 10 min,13 800 ×g 离心 15 min,取上清液 200 μl,置于 1.5 ml 的离心管中,氮气吹干。

### 2.4 样品衍生化

在上述氮气吹干的样品残渣中加入 15 mg/ml 的甲氧胺吡啶溶液 50 μl,涡旋 30 s,置于 70℃ 的烘箱中反应 60 min,再加入 MSTFA(含 1% 的 TMCS) 50 μl,涡旋 1 min,室温反应 30 min,再加入 100 μl 正庚烷,涡旋 30 s,1 500 ×g 离心 5 min,取上清液 100 μl 至进样小瓶。

### 2.5 GC-MS 分析

色谱条件:色谱分离采用 Agilen DB-5MS 气相色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm),程序升温:起始温度 70℃,保持 3 min,以 4℃/min 的速率升温至 220℃,然后以 10℃/min 升至 300℃并保持 6 min,进样口温度 250℃,分流比 10:1,传输线温度 260℃,载气为高纯氦气,流速 1 ml/min,进样量 1 μl。质谱条件:采用 EI 离子源,电子能量 70 ev,离子源温度 200℃;质量范围(m/z):50~650 amu;溶剂延迟时间 6 min,质谱采集时间 50 min。

### 2.6 数据分析

原始数据经 Xcalibur File converter 工具转换为通用的 CDF 格式。转换后的数据进一步通过 R 软件 XCMS 程序包进行峰校正和峰积分,最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的三维数据矩阵。由于 GC-MS 本身具有明显复杂性,同一保留时间下存在多个离子碎片,因此,采用了无靶标过滤的方式,即只保留同一保留时间下峰度最强的离子(保留时间窗为 0.01 min)。采用 80% 规则来去除缺失值,即去除在某一组中出现频率(非零值)低于 80%

的质谱离子<sup>[7]</sup>。为减小样品制备及仪器不稳定带来的误差,在进行模式识别前将数据用内标进行校正,并进行分面积归一化,将所得的各离子积分数据以Excel格式存储。将归一化后的数据导入SIMCA-P V11.0 (Umetrics, Sweden)软件进行偏最小二乘法-判别式分析(PLS-DA),根据相关R<sup>2</sup>, Q<sup>2</sup>值对模型进行评价。对差异代谢物进一步进行双侧t检验分析(模型组与对照组),当P<0.05时,认为差异有统计学意义。

表1 生化指标检测结果

组别	钙含量 (mmol/gprot)	MDA含量 (nmol/mgprot)	CuZn-SOD活力 (u/mgprot)	GSH含量 (μmol/gprot)	CAT活力 (U/mgprot)
对照组	0.027±0.005	0.49±0.011	108.96±1.12	10.86±0.07	15.07±1.01
模型组	0.099±0.008*	1.30±0.492*	56.55±3.96*	6.03±1.69*	7.98±1.03*
给药组	0.063±0.011#	0.89±0.35#	78.52±8.77#	7.05±1.56#	8.52±0.92#

\*P<0.05,与对照组比较;#P<0.05,与模型组比较

### 3.2 基于GC-MS的血清代谢轮廓分析

获取稳定重现的代谢组学数据是代谢组学研究成功的关键。为了评价分析系统的稳定性,本研究用等体积混合来自每只小鼠血清作为质控样品,采用与实际样品同样的前处理方法,在样品序列之前连续进样6针,并平均分布在实测样品序列中,一共分析9次。随机选择了8个色谱峰(图1),考察了其在9次重复分析中保留时间和峰面积的稳定性。结果显示色谱峰保留时间RSD<0.11%,峰面积RSD<2.82%,表明该分析系统稳定可靠。

### 3.3 多变量统计分析和潜在生物标志物的鉴定

经过数据处理后,GC-MS数据集得到了141个离子。采用了有监督的PLS-DA方法对两组数据进行分析,如图2A所示,结果显示对照组和模型组在所建立的数据模型中表现出良好的拟合度和预测能力(R<sup>2</sup>X=0.85, R<sup>2</sup>Y=0.96, Q<sup>2</sup>=0.93)。采用置换检验来进行模型验证,经200次置换检验后产生的截距R<sup>2</sup>=0.256, Q<sup>2</sup>=-0.289(图2B),表明模型具有良好的预测能力和可靠性。VIP值反映了各变量在模型建立中的重要性,本研究以VIP≥1和双侧t检验(P<0.05)分析,筛选鉴定了14个与结晶肾损伤相关的代谢产物,结果如表2所示。

### 3.4 潜在标志物生物学意义的解释

泌尿系结石是全球性常见病,其发病率约10%~15%,并有逐年增高的趋势<sup>[8]</sup>。结晶是结石的早期表现,对结晶肾损伤的研究有助于泌尿系结石的早期诊断。本研究利用代谢组学方法鉴

## 3 结果与讨论

### 3.1 生物化学指标的测定

生化指标测定结果见表1。与对照组相比,模型组中钙含量与MDA含量明显升高;CuZn-SOD活力,GSH含量及CAT活力显著下降,而金钱草干预组与模型组相比各指标均发生明显的回调,表明金钱草提取物对结晶肾损伤具有一定的预防治疗作用。

别了与结晶肾损伤密切相关的14种代谢物。查询KEGG数据库,我们发现这些代谢物主要涉及嘌呤代谢、氨基酸代谢、糖代谢等途径。血清中尿素浓度主要受肾功能、蛋白质摄入量和分解代谢情况的影响,血清尿素含量升高通常意味着肾脏疾病的发生,如急性肾衰、慢性肾炎、肾动脉硬化、肾结石等<sup>[9]</sup>。与对照组相比,模型组中的尿素含量显著升高,这也与临床上用血清中的尿素水平来诊断肾损伤程度的方法一致。

与正常组比较,模型组中的多种氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、脯氨酸含量明显降低,表明结晶肾损伤小鼠体内存在氨基酸代谢异常。甘氨酸作为抗氧化剂,可以延缓氧自由基对肾脏的损害,通过调节肾脏抗氧化酶、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-三磷酸腺苷酶、脂质过氧化产物丙二醛和一氧化氮等物质的水平来保护肾脏<sup>[10]</sup>。模型组中甘氨酸的含量显著降低,表明小鼠肾脏受损严重。支链氨基酸在蛋白合成、能量代谢、脂类代谢等方面中起着重要的作用。模型组中缬氨酸和异亮氨酸的含量明显降低,可能是由于严重的肾脏损伤导致机体能量供应不足,从而代偿性的利用支链氨基酸作为能量的供给。另外,慢性肾脏病晚期患者,因代谢性酸中毒而导致支链氨基酸分解<sup>[11]</sup>,也可能是结晶肾损伤小鼠体内支链氨基酸含量下降的原因之一。

乳酸是机体内重要的酸性物质,其代谢与机体内的氧化还原反应和能量代谢密切相关<sup>[12]</sup>。模型组中的乳酸含量明显升高,一方面可能是由于乙醛

酸盐诱导的结晶肾损伤导致糖酵解加强,使得以乳酸为底物的糖异生途径产生阻碍,从而导致乳酸含量的升高;另一方面可能是由于肾脏受损产生大量

的自由基,造成组织细胞受损,导致内酶外泄入血,使得各组织细胞中的乳酸脱氢酶含量增加,造成机体乳酸的蓄积。

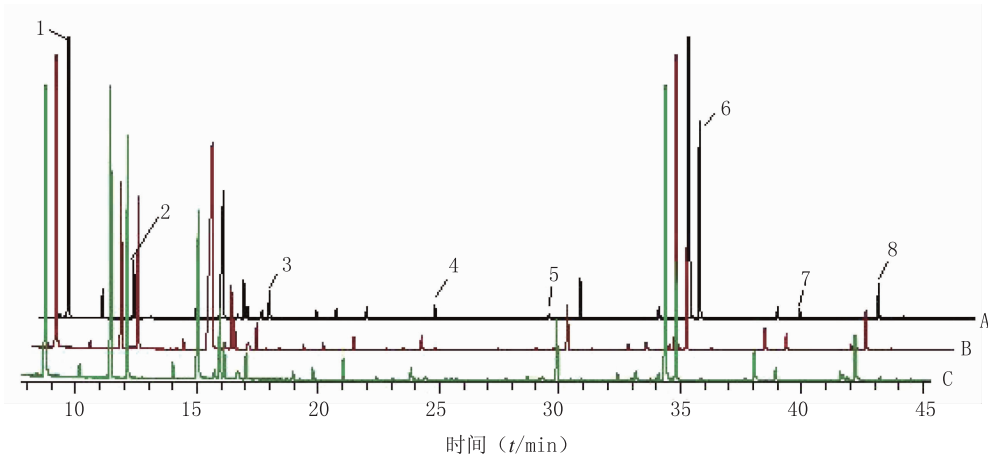


图1 小鼠血清典型的GC-MS总离子流图

A. 对照组; B. 结晶肾损伤模型组; C. 金钱草干预组; 1. 乳酸; 2.  $\beta$ -羟基丁酸; 3. 甘氨酸; 4. 脯氨酸; 5. D-果糖; 6. 葡萄糖; 7. 肌醇; 8. 硬脂酸

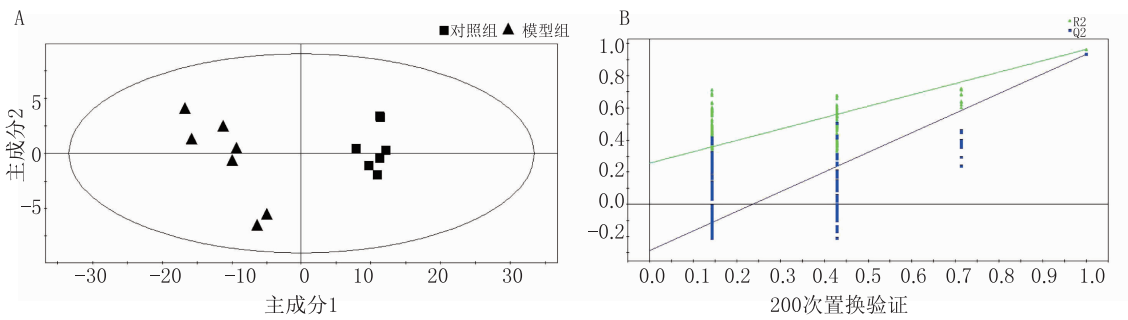


图2 基于GC-MS数据的正常组和模型组PLS-DA分析的得分图(A)和置换验证结果图(B)

表2 结晶肾损伤相关的潜在标志物及其代谢通路

序号	保留时间(t/min)	分子式	代谢物	趋势 <sup>a</sup>	代谢通路
1	8.76	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	乳酸	↑***	糖酵解
2	11.44	H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	草酸	↑***	乙醛酸代谢
3	12.15	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	$\beta$ -羟基丁酸	↑***	脂肪酸代谢
4	14.02	C <sub>3</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	缬氨酸	↓**	支链氨基酸代谢
5	15.13	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	尿素	↑**	嘌呤代谢
6	16.04	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	丙三醇	↑*	甘油磷脂代谢
7	17.03	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	甘氨酸	↓**	谷胱甘肽代谢
8	23.83	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	脯氨酸	↓***	精氨酸辅氨酸代谢
9	33.14	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	鸟氨酸	↓**	精氨酸辅氨酸代谢
10	34.37	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	葡萄糖	↓***	糖代谢
11	34.80	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	果糖	↓***	糖代谢
12	38.03	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	软脂酸	↑***	脂肪酸代谢
13	38.92	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	肌醇	↑***	磷脂代谢
14	41.19	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸	↑***	脂肪酸代谢

<sup>a</sup>模型组与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

### 3.5 金钱草的干预治疗

金钱草作为排石之要药,其临床作用已得到验证,但其作用机制尚不明确。以结晶肾损伤相关的标志物为监测指标可以评价金钱草的治疗作用。将正常对照组,结晶肾损伤模型组以及金钱草干预组采用无监督的PCA分析,其得分如图3所示,各组在第一主成分上得到了良好的区分,而金钱草干预组介于模型组和对照组之间,比较潜在标志物的相对含量发现,9种代谢物的含量发生明显逆转(图4),结合血清生化分析,我们推断金钱草能够功能性的调节糖代谢,脂类代谢和氨基酸代谢途径发挥抗结晶肾损伤作用。

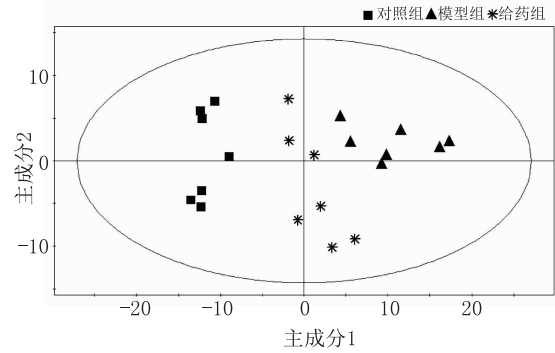


图3 正常组、结晶肾损伤模型组、金钱草干预组的主成分分析得分图

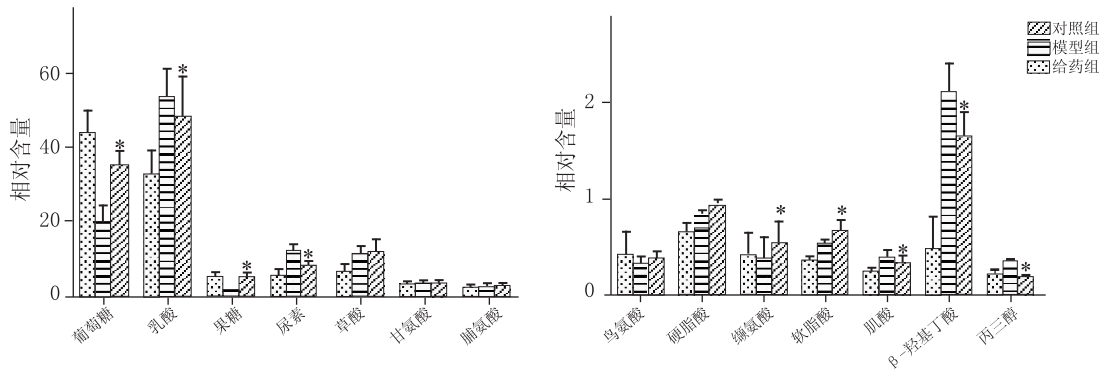


图4 14种潜在标志物在对照组、模型组和给药组中的相对含量变化

\*  $P < 0.05$ , 与模型组比较

## 4 结论

本研究建立了GC-MS代谢组学分析的方法,通过PLS-DA筛选出与结晶肾损伤密切相关的14种潜在生物标志物,主要涉及了嘌呤代谢、氨基酸代谢、糖代谢等途径。基于这14种标志物,对金钱草提取物的预防治疗结晶肾损伤模型进行了评价,结果表明金钱草提取物能够回调部分潜在标志物的相对含量,恢复失衡的代谢通路,发挥预防治疗作用。本研究为肾结石的早期诊断及金钱草的进一步开发应用提供实验依据。

### 【参考文献】

- [1] 简宇,马进. 慢性肾衰竭中西医结合治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(11):198-201.
- [2] 李昕. 慢性肾功能衰竭并发症的研究进展[J]. 医学信息:中旬刊,2010,5(5):1334.
- [3] 李飞艳,周日宝,刘群群. 金钱草及其混伪品的微性状鉴定[J]. 海峡药学,2018,30(7):39-41.
- [4] 武维波,刘永,刘桂营. 利尿排石汤治疗泌尿系结石780例[J]. 实用中医药杂志,2013,29(7):559.
- [5] 赵建一. 金钱草治疗尿结石的机理作用研究[J]. 中医临床研

究,2013,5(16):37-38.

- [6] GUO L, TAN G G, LIU P, et al. Three plasma metabolite signatures for diagnosing high altitude pulmonary edema [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15126.
- [7] BIJLSMA S, BOBELDIJK I, VERHEIJ E R, et al. Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation [J]. Anal Chem, 2006, 78(2): 567-574.
- [8] EDVARDSSON V O, INDRIDASON O S, HARALDSSON G, et al. Temporal trends in the incidence of kidney stone disease [J]. Kidney Int, 2013, 83(1): 146-152.
- [9] 彭明,顾向明,杜国有,等. 泌尿系结石患者血清胱抑素C的含量变化分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 172-173.
- [10] ZAKARIA F A. Effect of oxygen derived free radicals and glycine on sodium-potassium adenosine triphosphatase in the basolateral membrane of the kidney in ischemia-reperfusion [J]. Saudi Med J, 2002, 23(11): 1380-1385.
- [11] GARIBOTTO G, BONANNI A, VERZOLA D. Effect of kidney failure and hemodialysis on protein and amino acid metabolism [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012, 15(1): 78-84.
- [12] 张珺,尹磊,王昭君,等. 脓毒症相关性肾损伤临床特征及预后分析[J]. 宁夏医学杂志, 2018, 40(9): 807-809.

[收稿日期] 2018-12-13 [修回日期] 2019-05-07

[本文编辑] 陈盛新