

## 抗结核药物异烟肼肝毒性时效关系的代谢组学

廖 艳<sup>2</sup>, 彭双清<sup>1</sup>, 颜贤忠<sup>3</sup>, 张立实<sup>4</sup>

<sup>1</sup>中国人民解放军疾病预防控制中心毒理学评价研究中心, 北京 100071

<sup>2</sup>北京中医药大学 基础医学院养生康复系, 北京 100029

<sup>3</sup>国家生物医学分析中心, 北京 100850

<sup>4</sup>四川大学 华西公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 成都 610041

通信作者: 彭双清 电话: 010-66949631, 电子邮件: pengsq@hotmail.com

**摘要:** **目的** 研究异烟肼灌胃后不同时段大鼠尿液的代谢表型改变及其与组织病理学和血浆生化指标变化的相关性, 探讨代谢组学在药物毒理学研究中的应用。 **方法** Wistar 大鼠连续经口灌胃 0、50、100、200 和 400 mg · kg<sup>-1</sup> 异烟肼 3、7、14 d, 收集给药前 24 h 及给药期间每天 24 h 的尿液, 测定质子核磁共振 ( <sup>1</sup>H NMR ) 谱, 并进行血浆生化指标测定和肝脏组织病理学检查。 **结果** 常规毒性研究方法显示异烟肼在较高剂量、较长给药时间 ( 7 d 以上 ) 时表现出肝毒性, 并且有较好的时间-效应关系。对大鼠尿液进行代谢组学研究显示各组动物代谢谱各不相同, 随着给药时间的变化, 大鼠尿液 <sup>1</sup>H NMR 谱发生一定改变, 代谢谱的改变与常规毒性检测指标相符且更灵敏。与正常对照组比较, 给药组尿样 <sup>1</sup>H NMR 谱葡萄糖和牛磺酸显著增加, 2-酮戊二酸和柠檬酸显著降低。 **结论** 大鼠尿液 <sup>1</sup>H NMR 代谢轨迹与异烟肼毒性作用时间密切相关, 异烟肼引起的肝毒性与线粒体功能受损、三羧酸循环中能量代谢异常及葡萄糖代谢紊乱有关。代谢组学分析在毒理学研究中有广泛的应用前景。

**关键词:** 代谢组学; 核磁共振技术; 模式识别; 异烟肼; 肝毒性

**中图分类号:** R99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X( 2007 )06-0730-08

## Metabonomics Profile of Urine from Rats Administrated with Different Treatment Period of Isoniazid

LIAO Yan<sup>2</sup>, PENG Shuang-qing<sup>1</sup>, YAN Xian-zhong<sup>3</sup>, ZHANG Li-shi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research and Evaluation Center for Toxicology, Beijing Institute of Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China

<sup>2</sup>Department of Rehabilitation, School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

<sup>3</sup>National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China

<sup>4</sup>Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: PENG Shuang-qing Tel: 010-66949631, E-mail: pengsq@hotmail.com

**ABSTRACT: Objective** To study the effect of different treatment period of isoniazid ( INH ) on the metabonomic profile of rat urine and its relationship with traditional toxicity evaluation of blood biochemical indicators and histopathology and to explore the feasibility of metabonomics in the application of drug toxicity. **Methods** Sixty male Wistar rats were orally administrated with 0, 50, 100, 200, and 400 mg · kg<sup>-1</sup> INH for 3, 7, and 14 days, respectively. Rat urine was then collected and its <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance ( NMR )

spectra were acquired. All animals underwent traditional toxicity evaluation. **Results** Hepatotoxicity was revealed by traditional toxicity evaluation in rats treated with higher dosage and longer treatment of INH. Time-response relationship existed during the treatment. Time-dependent metabonomics changes conformed with the results of traditional toxicity evaluation. The urine metabonomics showed a trajectory bias from those of the controls or pre-administration, and such bias exaggerated along with the prolongation of treatment, indicating a severer toxic injury. Along with the increase of the concentrations of urinary taurine and glucose and the decrease of the concentrations of urinary citrate and 2-oxoglutarate, the  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine in rats treated with INH also changed. **Conclusions** The metabonomics technique can distinguish the onset and development of toxicity, which helps track and identify biomarkers. The hepatic toxicity induced by INH is related to the injury of mitochondrial function, reduction of energy metabolism in tricarboxylic acid cycle, and perturbations in the metabolism of glucose and lipid. The effect of INH on the rat urine metabonomic profile is related with INH toxicology. Therefore, metabonomics can be recognized as an ideal technique to explore and evaluate the drug toxicities.

**Key words:** metabonomics; nuclear magnetic resonance; pattern recognition; isoniazid; hepatotoxicity

*Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(6): 730–737

近年来,国外开始利用代谢组学<sup>[1]</sup>进行早期药物毒性研究。代谢组学是一种检测整个机体代谢变化的方法,主要利用核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)等方法测定尿液或血液等生物样本,通过模式识别和主成分分析(principal component analysis, PCA)<sup>[2]</sup>确定内源性小分子代谢物成分的变化,对代谢产物谱进行动态追踪,从而进行药物毒理机制和毒性标志物的研究<sup>[3]</sup>。

代谢组学应用于毒理学研究的基本原理是,毒性化学物破坏正常细胞的结构与功能,改变细胞代谢途径中内源性代谢物的稳态,从而通过直接或间接效应改变流经靶组织的血浆成分。因此,体内某种生物分子或代谢物的动态变化可以作为毒性损害的评价指标。因为NMR测得的生化变化是相同浓度下单个或多个分子变化情况的反映,这种代谢物的“整体模式”或“指纹”比单一靶标具有更好的一致性和预见性。不同的毒作用效应使代谢产物在浓度和组成上各自发生特征性的改变,通过对化学物代谢图谱的信息分析可以帮助识别和确认毒物靶标,有助于毒作用的机制研究和毒性效应的检测与推断。

异烟肼(isoniazid, INH)自1952年问世后一直广泛用于抗结核治疗,具有疗效高、口服方便、价廉等优点。INH对结核杆菌有选择性作用,抗菌力强。肝脏毒性是INH的主要不良反应。本研究以INH为代表型药物,在前期利用代谢组学对INH染毒量效关系研究基础上<sup>[4]</sup>,研究不同时段INH染毒后大鼠尿液代谢表型的变化,探讨代谢组学在药物

毒性研究中的应用前景。

## 材料和方法

**动物、试剂和仪器** Wistar大鼠,SPF级,雄性,体重120~160 g,由军事医学科学院实验动物中心提供。动物合格证号SGXK(京)2002-2003。动物自由摄食饮水,饲养室光照12 h,黑暗12 h,室温20~22℃,相对湿度35%~75%。INH购自Sigma公司,D<sub>2</sub>O购自北京京巨化工科技有限责任公司;2,2,3,3-三甲基甲硅烷丙酸{3-(trimethylsilyl)[2,2,3,3-2H<sub>4</sub>]propionate, TSP}购自加拿大默克公司。Varian<sup>UNITV</sup> INOVA 600型超导傅立叶变换NMR仪购自美国瓦立安公司。

**实验设计** 将60只大鼠随机分为以生理盐水为溶剂的对照组和50、100、200和400 mg·kg<sup>-1</sup> INH 5组,每组12只。每天单次灌胃给药,对照组和给药组在给药3 d次日、给药7 d次日、给药14 d次日各处死4只大鼠用于血液生化指标和组织病理学检查,并计算体重增加率和肝脏指数。

**尿液的收集和处理** 采用代谢笼法收集每只大鼠给药前24 h及给药期间每天24 h的尿液。代谢笼集尿器置于冰上,加入1% NaN<sub>3</sub>水溶液作为防腐剂。尿样3 000 r/min离心10 min后,取上清液置-70℃冰箱保存备用。NMR测量前样品准备:取溶解后的尿样400 μl,尿样中加入200 μl缓冲液(0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7.4),放置10 min,4℃下

3 000 r/min 离心 10 min；取上清液 600 μl，添加 50 μl 的 D<sub>2</sub>O 和 10 μl 的 0.1% TSP，转入 5 mm NMR 样品管中测试。

**血浆生化指标测定** 日立 7020 全自动生化分析仪测定血浆丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、甘油三酯、白蛋白、总蛋白、葡萄糖、血清总胆红素。数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。

**肝脏病理学检查** 给药结束 24 h 后，处死大鼠，完整分离肝脏，称重，计算肝脏指数 [ 肝脏指数 = ( 肝重/体重 ) × 100% ]，并做病理组织学检查。

**NMR 数据采集与分析** NMR 数据采集与分析方法参考文献 [ 5 ]。在军事医学科学院生物医学分析中心核磁共振实验室进行检测，27℃ 条件下，在 Varian <sup>UNITY</sup> INOVA 600 超导脉冲傅立叶变换 NMR 谱仪上用弛豫时间编辑 ( carr-purcell-meiboom-gill，CPMG ) 和扩散编辑 ( longitudinal eddy-delay，LED ) 相关脉冲序列，采用预饱和方式抑制水峰，饱和时间为 2 s，混合时间为 0.15 s，谱宽 7 000 Hz，采样点数 64 k，累加次数 128 次，预饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减 ( free induction decay，FID ) 信号经过 32 k 傅立叶变换转为 一维 NMR 谱图。以 TSP 为化学位移参考峰的位置，设为 0 ppm。

调用 VNMR 软件中的程序将 <sup>1</sup>H 谱按默认值 ( 9.5 ~ 0.5 ppm，每段为 0.04 ppm ) 进行分段积分。同时排除以溶剂峰为中心的部分 ( δ 4.6 ~ δ 5.0 ) 和包含尿素峰的部分 ( δ 5.5 ~ δ 6.2 )，在分析前去除药物代谢产生的峰谱位移 ( δ 1.9 ~ δ 2.14、δ 2.46 ~ δ 2.66、δ 2.74 ~ δ 2.94 ) 所在的宽峰，加入柠檬酸所在的峰谱 ( δ 2.50 ~ δ 2.58、δ 2.66 ~ δ 2.74 )，将所产生的所有积分数据归一化，以 Excel 文件贮存，用于模式识别分析。

**主成分分析法 ( principal component analysis，PCA ) 分析** 先将积分值进行中心化和比例换算处理，再将上述所得数据文件利用 SIMCA-P10.0 软件包 ( Umetrics AB，Umeå，Sweden ) 进行 PCA 统计分析。

结 果

**大鼠体重的变化** 与对照组相比，给药组随着给药天数增加，大鼠表现出呆顿、倦怠、毛色干枯、食欲降低、体重减轻、肝指数增加 ( 表 1 ) 等现象。

**血浆生化指标变化** 与对照组相比，给药组的丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶和总胆红素均有不同程度地变化，并呈时间依赖性 ( 表 2 )。

表 1 异烟肼各处理组体重增加率和肝脏指数的改变  
Table 1 Effects of INH on the changes of rat weight and liver index ( %，n = 4 )

分组 Group	体重增加率 Weight increase rate			肝脏指数 Liver index		
	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d
对照组 Control	14.0 ± 4.2	35.1 ± 5.0	70.8 ± 6.3	4.02 ± 0.28	4.01 ± 0.23	3.60 ± 0.21
给药组 INH ( mg · kg <sup>-1</sup> )						
50	12.9 ± 2.6	28.9 ± 4.6	60.5 ± 6.4 *	4.36 ± 0.41	4.20 ± 0.23	4.21 ± 0.19
100	11.7 ± 3.2	22.4 ± 3.0 *	55.0 ± 3.9 *	4.42 ± 0.81	4.43 ± 0.32	4.37 ± 0.29
200	10.0 ± 3.0	13.3 ± 3.7 *	39.5 ± 4.0 *	4.46 ± 0.51	4.70 ± 0.30	4.77 ± 0.35 *
400	7.6 ± 3.0	8.6 ± 3.4 *	34.9 ± 3.2 *	4.58 ± 0.58	4.85 ± 0.42	4.86 ± 0.48 *

INH：异烟肼；与对照组相比，\* P < 0.05  
INH：isoniazid；\* P < 0.05 compared with control group

表 2 异烟肼各处理组大鼠血浆生化指标的改变  
Table 2 Effects of INH on selected clinical chemistry parameters ( n = 4 )

分组 Group	ALT ( U · L <sup>-1</sup> )			AST ( U · L <sup>-1</sup> )			STB ( μmol · L <sup>-1</sup> )		
	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d
对照组 Control	13.5 ± 2.4	14.2 ± 3.1	13.8 ± 2.4	58.0 ± 4.7	63.0 ± 5.2	60.0 ± 4.2	3.76 ± 0.23	3.10 ± 0.19	3.30 ± 0.14
给药组 INH ( mg · kg <sup>-1</sup> )									
50	20.1 ± 4.2	23.0 ± 3.0	27.0 ± 4.7	68.0 ± 4.3	77.8 ± 2.1	86.4 ± 2.4	5.20 ± 1.33	5.93 ± 0.51	7.24 ± 1.47
100	21.8 ± 5.2	27.1 ± 4.3	33.0 ± 5.2 *	72.0 ± 5.6	81.3 ± 5.5	91.0 ± 6.4	5.45 ± 2.78	6.22 ± 2.16	8.10 ± 2.66
200	26.2 ± 5.7	28.1 ± 7.2 *	42.2 ± 5.3 *	75.8 ± 11.2	85.7 ± 11.3	107.2 ± 8.8 *	5.77 ± 1.31	6.52 ± 1.48	9.13 ± 1.81 *
400	29.0 ± 7.1 *	40.2 ± 10.1 *	56.6 ± 2.7 *	81.0 ± 18.7	89.5 ± 22.2 *	112.5 ± 21.2 *	6.09 ± 1.27	7.43 ± 1.53	9.66 ± 2.61 *

ALT：丙氨酸氨基转移酶；AST：天冬氨酸氨基转移酶；STB：血清总胆红素；与对照组相比，\* P < 0.05  
ALT：alanine aminotransferase；AST：aspartate aminotransferase；STB：serum total bilirubin；\* P < 0.05 compared with control group

**肝脏组织病理学** 正常对照组大鼠肝小叶及肝细胞形态结构完整,中央静脉清晰,肝窦间隙未见扩张(图1A)。给药组给药3 d 动物肝脏未见毒性损伤;给药7 d  $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量动物出现肝脏小静脉周边肝细胞水样变性(图1B);给药14 d  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量肝组织病理学特征与正常对照基本一致;100 和  $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量可见肝脏静脉周边肝细胞肿胀、水样变性(图1C); $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  高剂量组大鼠不仅出现肝小叶中央静脉周围肝细胞浑浊肿胀,肝细胞显大片状水样变性,还有1例出现点状液化坏死灶(图1D 箭头所示)。

**尿液代谢组学** INH  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组在给药前、给药第3天、给药第7天和给药第14天的典型 $^1\text{H}$  NMR 谱图显示,随着给药时间的延长,大鼠尿液中主要内源性代谢物发生了一定改变(图2)。其他给药剂量组谱图在各个给药时间点也出现类似变化。

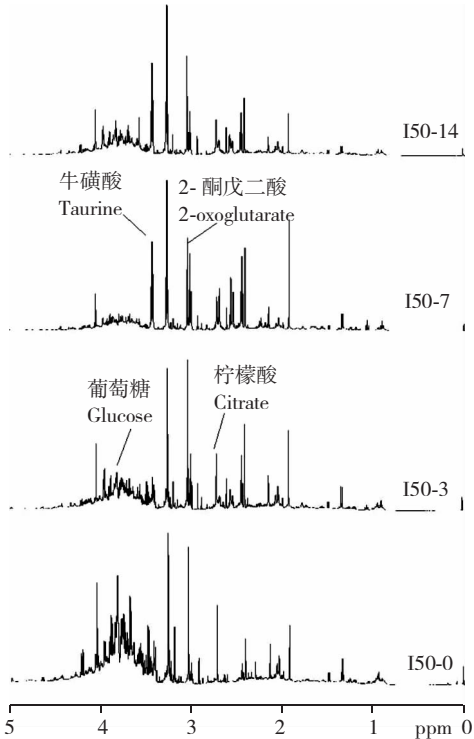


图2 INH  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组不同给药天数大鼠尿样的典型 $^1\text{H}$  NMR 谱图

**Fig 2**  $^1\text{H}$  NMR spectra after different treatment days in rats treated with INH  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$   
I50-0: 给药前; I50-3: 给药第3天; I50-7: 给药第7天; I50-14: 给药第14天  
 $^1\text{H}$  NMR: 质子核磁共振  
I50-0: before administration; I50-3: 3 days after administration; I50-7: 7 days after administration; I50-14: 14 days after administration  
 $^1\text{H}$  NMR:  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance

**PCA 分析结果** INH 处理的 200 和  $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组给药第1天 PC 积分值部分重叠(图3A), 给药第2天基本分开(图3B), 给药第3天已完全分开(图3C)。各剂量组与对照组在分值散点图中的相对位置不仅与其剂量呈较强的对应关系, 而且给药时间越长, 各剂量组的代谢谱越偏离对照组。

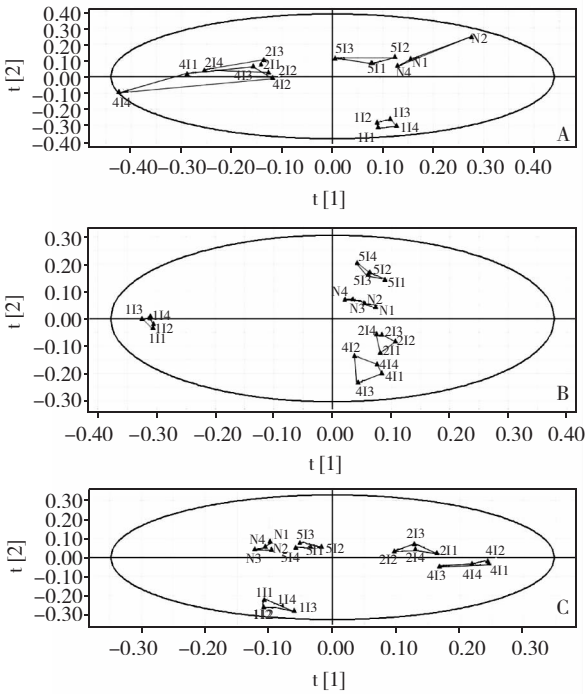


图3 给药不同天数后 INH 各剂量组每只大鼠尿样 PCA-Score 图

**Fig 3** Scores,  $t$  and plot of a 2-component PCA model on the  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine samples obtained from each rat of control group and INH group  
A. 1 day after administration; B. 2 days after administration; C. 3 days after administration  
 $t[1]$  和  $t[2]$  代表主成分中贡献最大的两个参数; 字母后样本编号 1~4 代表每一只动物; N = 对照; 5I = INH ( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 1I = INH ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 2I = INH ( $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 4I = INH ( $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )  
A. 1 day after administration; B. 2 days after administration; C. 3 days after administration  
The coordinates of  $t[1]$  and  $t[2]$  indicate the factors contributing most in principal components analysis; The sample number 1 to 4 after the letter indicate an individual animal; N = control; 5I = INH ( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 1I = INH ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 2I = INH ( $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 4I = INH ( $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

为研究给药组和对照组中同一只大鼠连续 15 d 的代谢轨迹,对每组第 1 号大鼠每天的<sup>1</sup>H NMR 谱峰积分值进行 PCA 分析,结果显示 INH (50 mg · kg<sup>-1</sup>) 组与对照组无交叉和重叠,自给药第 1 天起,

给药组大鼠的代谢谱明显偏离对照组和给药前的代谢成分,在给药期间随着时间点改变而表现出一定的轨迹特征(图 4)。其他给药剂量组同一只大鼠连续 15 d 的代谢轨迹出现类似变化。

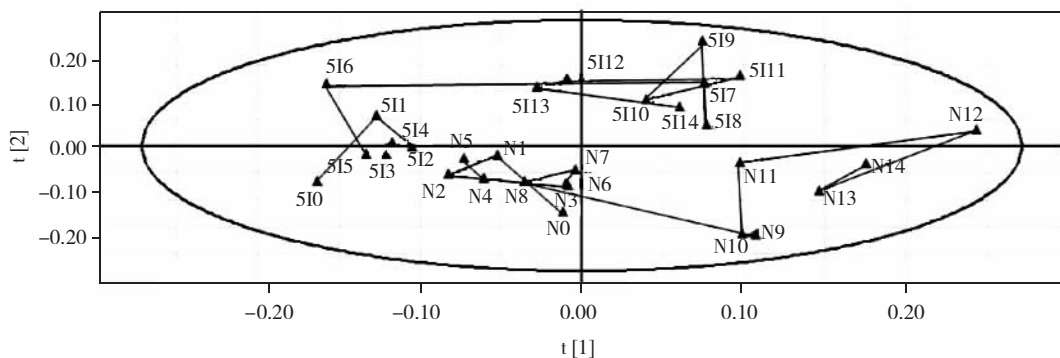


图 4 不同给药天数 INH (50 mg · kg<sup>-1</sup>) 组第 1 号大鼠和对照组第 1 号大鼠的尿样 PCA-Score 图

**Fig 4** Scores,  $t$  and plot of a 2-component PCA model on the <sup>1</sup>H NMR spectra of urine samples obtained (the 0 day to the 14 th day) from control group and 50 mg · kg<sup>-1</sup> INH group

N0 ~ 14 = 对照组给药第 0 ~ 14 天; 5I0 ~ 14 = INH (50 mg · kg<sup>-1</sup>) 给药第 0 ~ 14 天

N0-14 : 0-14 days after administration control group ; 5I0-14 : 0-14 days after administration INH 50 mg · kg<sup>-1</sup> group

为研究所有剂量组和对照组大鼠连续 15 d 的代谢轨迹,求出了每组大鼠每天<sup>1</sup>H NMR 谱峰积分平均值(给药 0 ~ 3 d 为 12 只大鼠、给药 4 ~ 7 d 为 8 只大鼠、给药 8 ~ 14 d 为 4 只大鼠),并进行了 PCA 分析。结果显示,各给药组与对照组及各给药组间均无交叉和重叠。自给药第 1 天起,各给药组大鼠的

代谢谱即明显偏离对照组和给药前的代谢成分,随着给药时间的延长,大鼠尿液代谢组表现出一定轨迹特征(图 5)。PCA 的因子载荷图显示,INH 组的葡萄糖(3.82 ppm)和牛磺酸(3.42、3.26 ppm)明显增加,2-酮戊二酸(3.02 ppm)和柠檬酸(2.54、2.58、2.7 ppm)明显降低(图 6)。

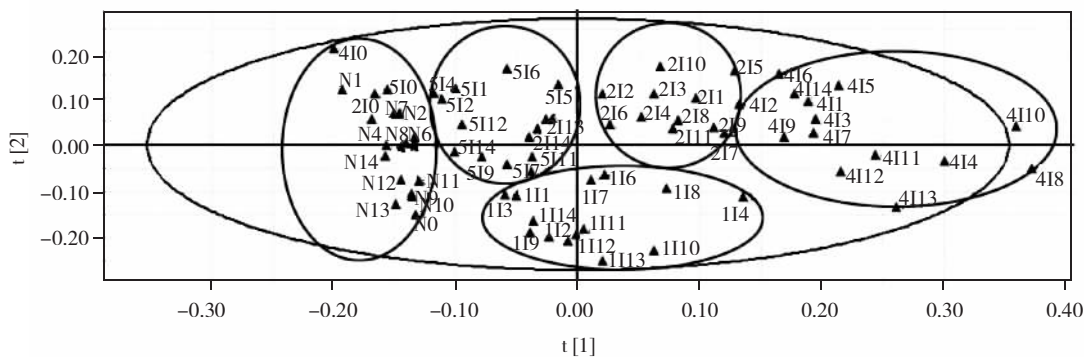


图 5 不同给药天数 INH 各剂量组与对照组所有大鼠尿样的 PCA-Score 图

**Fig 5** Scores,  $t$  and plot of a 2-component PCA model on the <sup>1</sup>H NMR spectra of urine samples (the 0 day to the 14 th day) obtained from control group and INH group

N0 ~ 14 = 对照组给药第 0 ~ 14 天; 5I0 ~ 14 = INH (50 mg · kg<sup>-1</sup>) 给药第 0 ~ 14 天; 1I0 ~ 14 = INH (100 mg · kg<sup>-1</sup>) 给药第 0 ~ 14 天; 2I0 ~ 14 = INH (200 mg · kg<sup>-1</sup>) 给药第 0 ~ 14 天; 4I0 ~ 14 = INH (400 mg · kg<sup>-1</sup>) 给药第 0 ~ 14 天

N0-14 : 0-14 days after administration control group ; 5I0-14 : 0-14 days after administration INH 50 mg · kg<sup>-1</sup> group ; 1I0-14 : 0-14 days after administration INH 100 mg · kg<sup>-1</sup> group ; 2I0-14 : 0-14 days after administration INH 200 mg · kg<sup>-1</sup> group ; 4I0-14 : 0-14 days after administration INH 400 mg · kg<sup>-1</sup> group

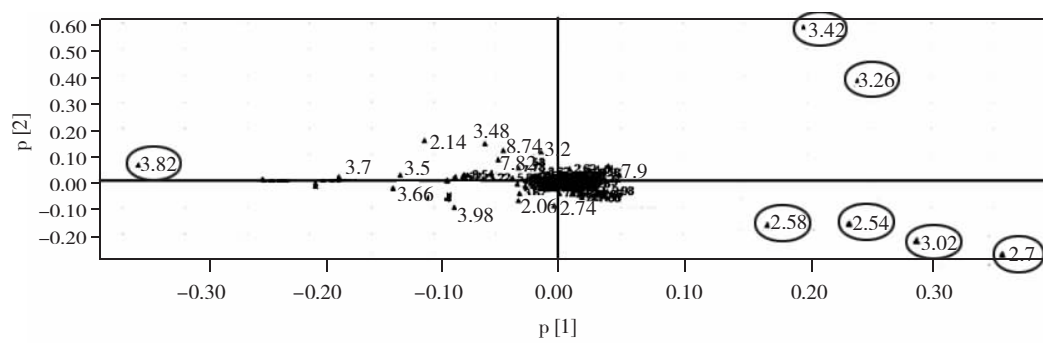


图 6 不同给药天数 INH 各剂量组与对照组所有大鼠尿样的 PCA-Loading 图

**Fig 6** Loadings,  $p$  and plot of a 2-component PCA model derived from the  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine samples ( the 0 day to the 14th day ) obtained from control group and INH group  
 圆圈表示各组之间有差异的“因子”  
 A plot of integral regions contribute the most to the separation between control group and INH group

讨 论

以动物体重、血浆生化指标和病理学检查等常规毒性评价方法为判断标准，INH 中、高剂量组在染毒 14 d 后表现出明显的肝毒性，并且有一定的时间-效应关系。肝细胞病理改变的显著特征为空泡变性，Bollard 等<sup>[6]</sup>证实肝及其类似物能引起脂类物质在肝脏中蓄积。肝细胞脂肪样变引起肝脏肿胀，可以部分解释染毒 14 d 后出现肝指数增加。

尿液的一维 $^1\text{H}$  NMR 谱图由成千上万条线组成，其中包括了数千种代谢物， $^1\text{H}$  NMR 谱图可以看作是很“精细”的代谢物成分图谱即代谢指纹图谱。但是 $^1\text{H}$  NMR 谱图必须通过 NMR 数据采集和分析转换成一维数据才能进行量化和统计分析。按默认范围对谱图上的波峰进行分段、积分并归一化后的数据构成的数据集代表了生物样品的代谢产物信息。PCA 的特点是将分散在这组变量上的所有信息集中到几个综合指标即主成分 PC 上，利用这些 PC 描述数据集内部结构，实际上起着数据降维的作用。

PCA 分析结果的输出形式为 PC 图（又称 Scores 图）和 PCA 的因子载荷图（又称 Loading 图）两种，前者是指某一组分的 NMR 谱峰与其他组分能完全分开，后者是指高分辨 NMR 可从复杂混合物中鉴别出该组分，所鉴别的组分可作为候选生物标志物，并已在毒理学研究中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

代谢组学不是针对一个细胞，而是针对一个完整的生物体系随时间而发生的代谢变化全过程进行检测、鉴别、定量和分类。用这样一个多维代谢轨

迹可以与正在发生的病理生理过程中的一些生物事件联系起来。本研究利用代谢组学技术对连续给药 14d INH 处理的大鼠进行全程代谢变化研究，结果表明随着给药时间的延长，大鼠尿液 $^1\text{H}$  NMR 谱发生一定改变（图 2）。代谢组学的优越性还在于其可以考察单个动物在药物处理后整个时程中的毒性反应，并进行主成分轨迹的时程分析。通过 PC 时点轨迹的 PCA 分析，可全面了解急性毒性反应及其恢复情况的时间依赖性。本研究表明，毒性发生和发展过程中代谢谱的改变比动物体重、血液生化指标和组织病理学等常规毒性评价方法的改变更灵敏。常规毒性评价方法在（较）高剂量组、（较）长给药时间才表现出肝脏损伤，与对照组比较，差异具有显著性；而给药组代谢谱的改变在给药第 1 天即表现出与对照组的差异（图 3）。此外，代谢谱的改变还与动物体重、血液生化指标和组织病理学的改变相对应，毒性越明显的时间点，经过 PCA 分析的代谢谱偏离对照越远（图 4、5）。药物的时间谱本身就是特定药理类型和机制的特征<sup>[8]</sup>。Nicholls 等<sup>[9]</sup>研究表明利用机体不同时间点代谢组的变化轨迹可以描述毒性发生和发展的全过程。这也充分证实了利用代谢组学技术进行毒性筛选的可能性<sup>[10]</sup>。

与传统的毒性研究方法比较，代谢组学分析方法具有无创性的特点。尿液分析不仅不会对机体造成任何损伤，且不受采样时间和频率限制，可进行连续动态的分析和检测，如本研究利用代谢组学全程动态地检测了大鼠给药 14 d 中每天机体变化情况，而传统方法只能选择几个时间点剖杀动物进行检测。

NMR 测得的生化变化是相同浓度下单个或多个

分子变化情况的反映,这种代谢物的“整体模式”或“指纹”比单一靶标具有更好的一致性和预见性。染毒后代谢组的改变能够体现机体染毒状态,从而了解毒性标志物随毒性发展的变化情况。对所有 INH 给药组大鼠和对照组大鼠的尿液进行分析,从其 PCA-Loading 图(图6)中得到与 INH 相对应代谢成分的改变,具体为给药组尿样<sup>1</sup>H NMR 谱葡萄糖和牛磺酸明显增加,2-酮戊二酸和柠檬酸明显降低。该结果与前期工作中异烟肼肝毒性代谢组学量效关系研究结果<sup>[4]</sup>相似。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。Jaeschke 等<sup>[11]</sup>研究表明尿液 NMR 分析中牛磺酸含量的变化是检测肝脏损伤的重要指标。大鼠给予 INH 处理后,尿中还发现柠檬酸和 2-酮戊二酸的降低,起初认为这种变化是因为进食减少和体重降低引起三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TAC)能量代谢异常,是机体非特异性生化改变<sup>[12]</sup>。然而,配对实验设计在控制体重因素后,肝的作用仍可导致柠檬酸、2-酮戊二酸和马尿酸等代谢产物的改变<sup>[13]</sup>。进一步研究证实肝及其类似物能够在体内和体外消耗 ATP,线粒体功能受损引起 TAC 中能量代谢异常,进而影响肝毒性<sup>[14]</sup>。线粒体功能受损引起能量代谢障碍也可以影响 TAC 中糖代谢,可以部分解释尿中葡萄糖浓度升高。综上,INH 引起的肝毒性与线粒体功能受损及 TAC 中能量代谢异常、葡萄糖代谢紊乱有关。当然,任何化学物的毒性机制不是单方面的,是一个错综复杂的过程,但利用代谢组学技术至少能在机体代谢方面给出很好的提示。

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常规检验方法无法比拟的优势<sup>[15,16]</sup>,因而广泛地应用于药物毒性和疾病诊断。但代谢组学分析也存在样品间变异、仪器动力学范围的局限、分析误差和当前有限的代谢组学数据库和数据交换版式等局限。相信随着研究的进一步深入,代谢组学技术在药物毒理机制信息和生物标志物研究中会有广泛的应用前景<sup>[17,18]</sup>。

(本文图1见插图第1页)

(志谢:本课题在研究过程中得到董延生、赵剑宇和陈合兵等人的大力协助)

## 参 考 文 献

- [1] Nicholson LK, Lindon JC, 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(11):1181-1189.
- [2] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance [J]. *Prog NMRS*, 2001, 39(1):1-40.
- [3] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, *et al.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2):153-161.
- [4] 廖 艳, 彭双清, 颜贤忠. 异烟肼肝毒性的代谢组学特征研究 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(4):288-292.
- [5] Nicholson JK, Buckingham MJ, Sessler PJ. High resolution proton NMR studies of vertebrate blood and plasma [J]. *Biochem J*, 1983, 211(3):605-615.
- [6] Bollard ME, Keun HC, Beckonert O, *et al.* Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204(2):135-151.
- [7] Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, *et al.* An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk: ApfCD mouse [J]. *FEBS Lett*, 2000, 484(3):169-174.
- [8] Azmi J, Griffin JL, Antti H, *et al.* Metabolic trajectory characterisation of xenobiotic-induced hepatotoxic lesions using statistical batch processing of NMR data [J]. *Analyst*, 2002, 127(2):271-276.
- [9] Nicholls AW, Holmes E, Lindon JC, *et al.* Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(8):975-987.
- [10] Robertson DG, Reilly MD, Sigler Re, *et al.* Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 57(2):326-337.
- [11] Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, *et al.* Mechanisms of hepatotoxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65(2):166-176.
- [12] Siculella L, Sabetta S, Di Summa R, *et al.* Starvation-induced posttranscriptional control of rat liver mitochondrial citrate carrier expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(3):418-423.
- [13] Sweatman BC, Manini JA, Waterfield CJ. <sup>1</sup>H NMR analysis of urine in toxicity studies: effects of reduced feeding [J]. *Toxicology*, 2001, 164(3):225-229.
- [14] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, *et al.* Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of

- biofluids [ J ]. Chem Res Toxicol ,2000 ,13( 6 ) :471-478.
- [ 15 ] Holmes E , Nicholson JK , 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.
- [ 16 ] Holmes E , Nicholls AW , Lindon JC , *et al.* Chemometric models for toxicity based on NMR spectra of biofluids[ J ]. Chem Res Toxicol ,2000 ,13( 6 ) :471-478.
- [ 17 ] Anthony ML , Sweatman BC , Beddall CR , *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.
- [ 18 ] Holmes E , Nicholson JK , Nicholls AW , *et al.* The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine[ J ]. Chemometrics Intel Lab Sys ,1998 ,44( 3 ) :245-255.

( 2007-08-10 收稿 )