

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.03.015

肝豆灵对铜负荷大鼠肝纤维化血清代谢组学的影响

张 娟^{*}, 鲍远程, 谢道俊, 童建兵, 周 磊, 杨 波, 金 珊, 沈 斌, 丁伟军

(安徽中医药大学第一附属医院, 安徽省合肥市梅山路 117 号, 230031)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202692); 安徽高校省级自然科学基金项目资助 (KJ2012Z223)

摘要 目的 探讨肝豆灵治疗肝豆状核变性 (WD) 肝纤维化的可能作用机制。方法 75 只 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、模型对照组、肝豆灵组、肝豆灵加青霉胺组、青霉胺组, 每组 15 只。除空白对照组外, 其余各组复制铜负荷大鼠模型共 12 周, 从第 7 周开始肝豆灵组给予肝豆灵 0.486 g/(kg·d), 青霉胺组给予青霉胺 0.09 g/(kg·d), 肝豆灵加青霉胺组给予以肝豆灵和青霉胺联合灌胃, 剂量同上。各组均每日灌胃 1 次, 共 6 周。第 13 周实验结束后, 各组大鼠留取血清标本, 运用代谢组学技术检测各组肝纤维化小分子代谢标志物的变化。结果 肝豆灵能明显提高铜负荷大鼠血浆亮氨酸、异亮氨酸、胆碱、葡萄糖、3-羟基丁酸的含量, 能降低糖蛋白、脂质、乳酸盐、丙酮酸盐的含量。结论 肝豆灵对铜负荷大鼠小分子代谢物有明显的调节效应, 对代谢异常的修复作用可能是治疗 WD 肝纤维化的作用机理之一。

关键词 肝豆状核变性; 肝纤维化; 肝豆灵; 代谢组学

肝豆状核变性 (wilson' disease, WD) 是常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病, 世界范围发病率为 1/10 万~1/3 万^[1]。WD 好发于青少年, 其病因是由 ATP7B 基因突变导致机体铜代谢异常, 过量的铜沉积在肝脏和脑等组织中所引起一系列临床表现的综合征^[2], 临床上以慢性肝脏病变、肾脏功能损害以及神经系统障碍等症状为主。代谢组学是继基因组学、蛋白组学之后发展起来的一门新学科, 是研究在细胞、组织、器官新陈代谢的动态进程中代谢组分尤其是小分子物质变化规律的一门科学。由于其可以从整体层面上了解生物体系各个模块的功能, 因此在肝脏疾病的研究中起了不可忽视的作用。研究表明, 肝脏是 WD 最先受累的脏器之一^[3]。由于 WD 为铜代谢障碍性疾病, 其肝脏代谢物谱的变化可能不同于其他肝脏疾病, 因此 WD 肝组织的代谢组学研究对于 WD 的病机、治疗及预后显得尤为重要。本课题组运用代谢组学技术分析具有通腑利湿、化瘀散结功效的肝豆灵对 WD 铜负荷大鼠肝纤维化代谢物谱的干预, 初步探讨其治疗 WD 肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 75 只, 雌雄各半, 3 月龄, 平均体重 (200±20) g, 购于南京医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (苏 2008-0004)。

1.2 药物

肝豆灵 (安徽中医药大学第一附属医院院内制剂, 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, 国药准字 H31022286。

1.3 主要试剂及仪器

硫酸铜 (上海国药集团, 批号: 20130126); 重水 (D₂O, 美国 CIL 公司, 批号: RC32-0803); 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: F20030816)。Varian NMR System 500 MHz 超导 NMR 谱仪 (美国瓦立安公司); TGL-20M 高速台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); 2, 2, 3, 3-三甲基甲硅烷基丙 (TSP, 美国 Aldrich 公司)。

* 通讯作者: zhangdoui2008@sina.com, 13856915538

1.4 动物分组及处理方法

75 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型对照组、肝豆灵组、肝豆灵加青霉胺组、青霉胺组, 每组 15 只。从实验第 1 天开始, 除空白对照组予以普通饲料外, 其余各组均参照文献 [6] 复制铜负荷大鼠模型, 即予含硫酸铜 1 g/kg 的饲料和 0.185% 硫酸铜的水, 饲养 12 周; 各组大鼠每天每只进食相等, 并自由饮水。从第 7 周第 1 天开始肝豆灵组给予肝豆灵 0.486 g/(kg·d); 青霉胺组给予青霉胺 0.09 g/(kg·d); 肝豆灵加青霉胺组给予以肝豆灵和青霉胺联合灌胃, 剂量同上。各组均每日灌胃 1 次, 共 6 周。

1.5 检测指标及方法

各组动物在第 13 周实验结束后, 禁食 12 h, 在 2% 的戊巴比妥钠腹腔麻醉下, 分别留取血清标本。每只大鼠取血 2 ml 置于普通生化管, 经 3000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 放入 -80℃ 冰箱储存, 送至厦门大学进行代谢组学检测。配置血清样品时, 取一份血清与两倍体积的磷酸盐缓冲液 (溶质: 0.2 mol/L Na_2HPO_4 或 0.2 mol/L NaH_2PO_4 , 溶剂为 80% H_2O 或 20% D_2O) 混合, 以消除 pH 对化学位移的影响, 并加入适量的 DSS (2, 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid) 作为化学位移零点的定标。配好后滴入 5 mm 样品管在 Vari-an Unity plus 500 MHz 谱仪上采集样品的一维 ^1H -NMR 谱图。实验采用 5 mm HCN 三共振探头, 温度 300 K, 谱宽 5 kHz, 信号累加 256 次, 采样点数 16 k, 采样 NOEPR-CPMG 脉冲序列, 其中预饱和和脉冲序列 (NOESYPRESAT) 用于抑制水峰信号, CPMG 自旋回波序列用来抑制由蛋白和脂蛋白等产生的宽峰而得到窄的谱线。序列 (NOESYPRESAT) 采样并抑制水峰信号。

1.6 统计学方法

采用 MestRe-C2.3 软件 (<http://qobruce.us.es/jsrgroup/MestRe-C>) 及自编软件 [8] 对谱图进行手动调相、基线校正和谱峰对齐。对 80.2—4.6 区域范围内做自适应积分, 数据采用 Pareto 标度化 (Pareto scaling) 进行预处理之后; 将积分数据归一化后构成数据矩阵, 并利用 PCA 和 PLS-DA 方法对数据矩阵进行统计分析。分析结果以得分图和负载图表示。

2 结果

2.1 截去乳酸前结果

先将模拟数据集进行自适应积分预处理, 将积

分数据归一化后构成数据矩阵, 矩阵每一行代表一个样本, 每一列与相应的化学位移区间 (变量) 相对应再进行 PLS-DA 分析, 得分图上每一个点代表了一个标本, 可以直观地看出各血清标本在空间上的位置; 负载图可以显示波谱中有哪些积分区段, 其中的每一个点代表了一个积分区段。组间分析结果如下 (图 1~图 4)。

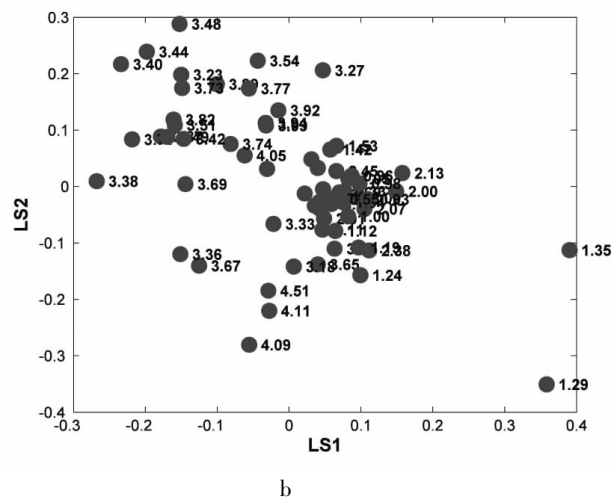
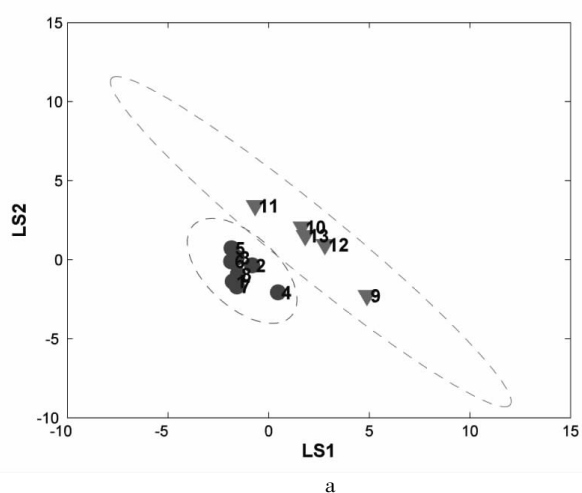
图 1a 表明, 在血清 ^1H -NMR 谱的 PC1~PC2 得分图中, 模型对照组与正常对照组能够明显地分开, 且各组内样本点聚集较好, 说明建模成功; 图 1b 为相应的 PCA 负载图, 其中每个点代表一个谱峰段, 通常在样本分组方向上如果谱峰段偏离零点越远, 表明这个谱峰段对分类的贡献越大, 越有可能是潜在的特征代谢物。

图 2~图 4 示, 模型对照组与各给药组能够明显地分开 (图 2a、3a、4a), 但不如肝豆灵加青霉胺组在 PC1 上分开的趋势大 (图 3a), PLS-DA 负载图 (图 2b、3b、4b) 给出了对分组贡献较大的代谢物的变化趋势。各给药组大鼠载荷图中, 1.35 这个谱峰段代表的是乳酸 (lactate), 它对分类的贡献最大, 掩盖了其他代谢产物的分类贡献, 提示其在铜负荷大鼠中的含量显著升高。在肝脏细胞中, 乳酸经由丙酮酸、乙酰辅酶 A 途径转变为脂肪酸、胆固醇、酮体和乙酸等物质, 亦可经由丙酮酸, 通过氨基转换作用生成丙氨酸, 参与蛋白质代谢。乳酸堆积可能的原因为高铜饮食诱导大鼠肝细胞损伤时, 乳酸循环发生障碍而导致。在下一步数据处理中, 截去 1.35 (lactate) 后再做 PLS-DA 分析。

2.2 截去乳酸进行分析

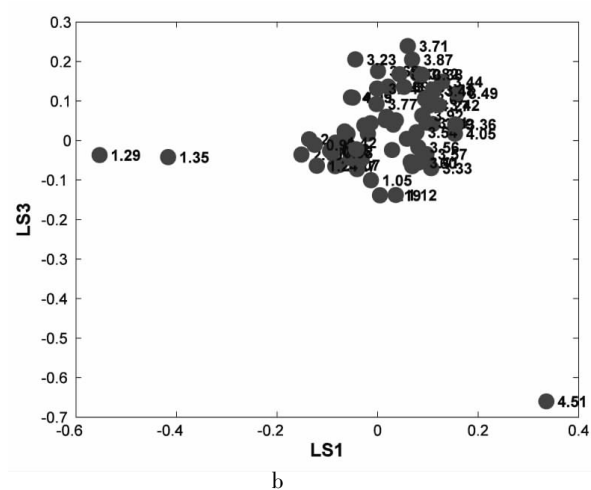
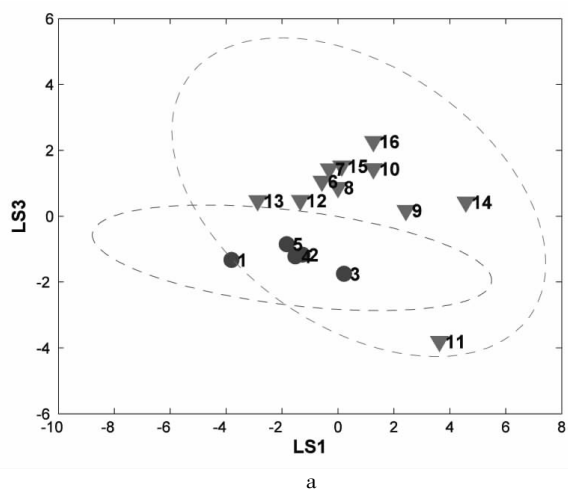
各组截去乳酸后得到 PLS-DA 的得分图和负载图分别如图 5~图 8 所示。

图 5~图 8 表明, 在血清 ^1H -NMR 谱的 PC1~PC2 得分图中 (图 6a、7a、8a), 模型对照组与各给药组都存在一定的分离趋势, 但肝豆灵加青霉胺组在 PC1 上分开的趋势最大 (图 7a), PLS-DA 负载图 (图 6b、7b、8b) 给出了对分组贡献较大的代谢物的变化趋势。根据负载图结合谱图, 在 80.94 - 1.0, 1.2、1.29、1.32、4.1、2.12、2.93、3.71、3.26、3.27、3.52、3.6、1.0、1.26、2.71、2.72 化学位移处找到了一些对分类贡献较大的代谢物, 如亮氨酸、异亮氨酸、胆碱、葡萄糖、3-羟基丁酸、糖蛋白、脂质、乳酸盐、丙酮酸盐等, 这些可能是各治疗组大鼠与模型对照组大鼠相比的血清特征代谢物。并且肝豆灵组血浆亮



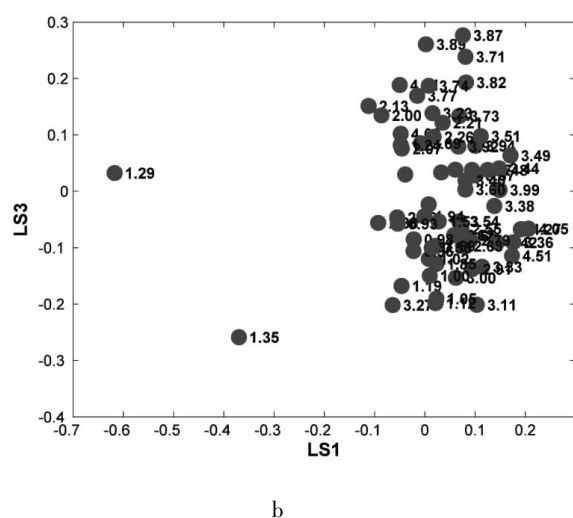
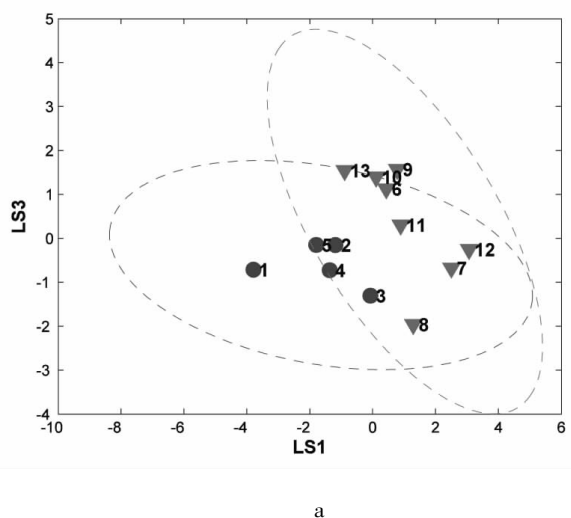
注: ●空白对照组; ▼模型对照组

图1 空白对照组和模型对照组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



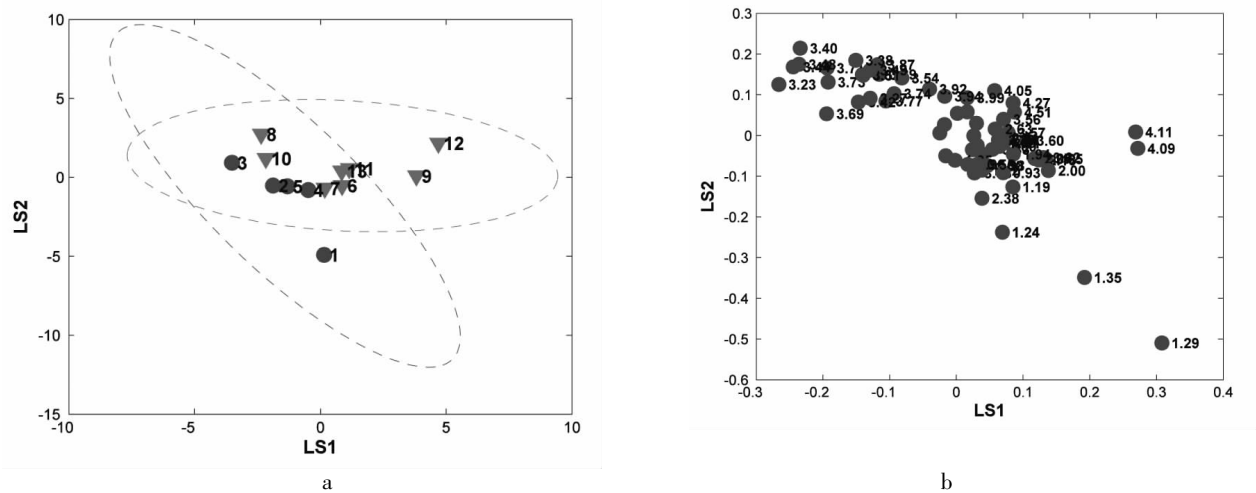
注: ▼铜模型对照组; ●青霉素组

图2 模型对照组和青霉素组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)

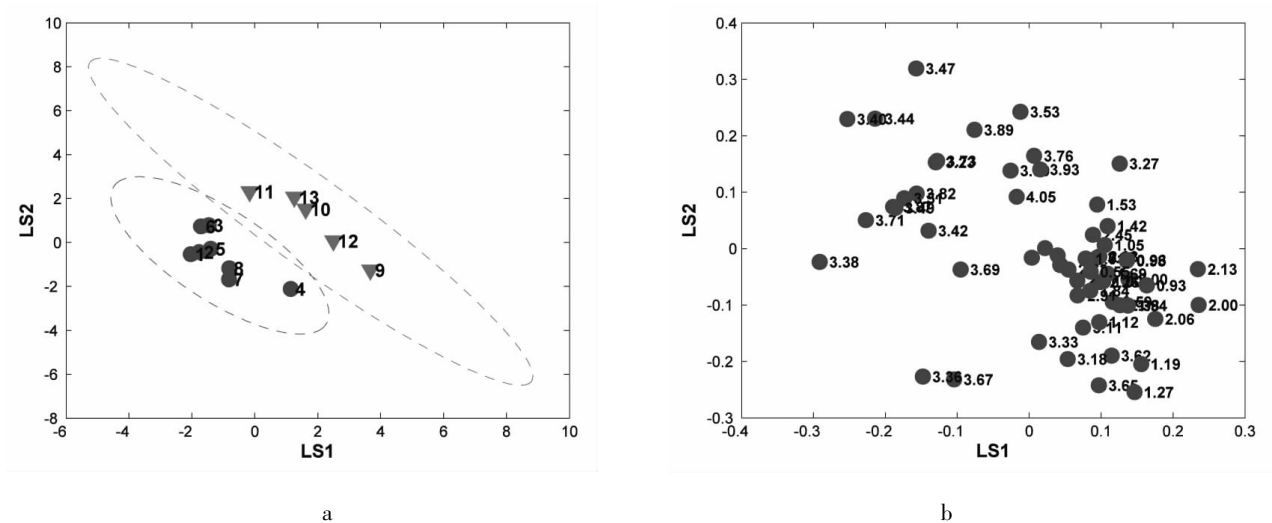


注: ▼模型对照组; ●肝豆灵加青霉素组

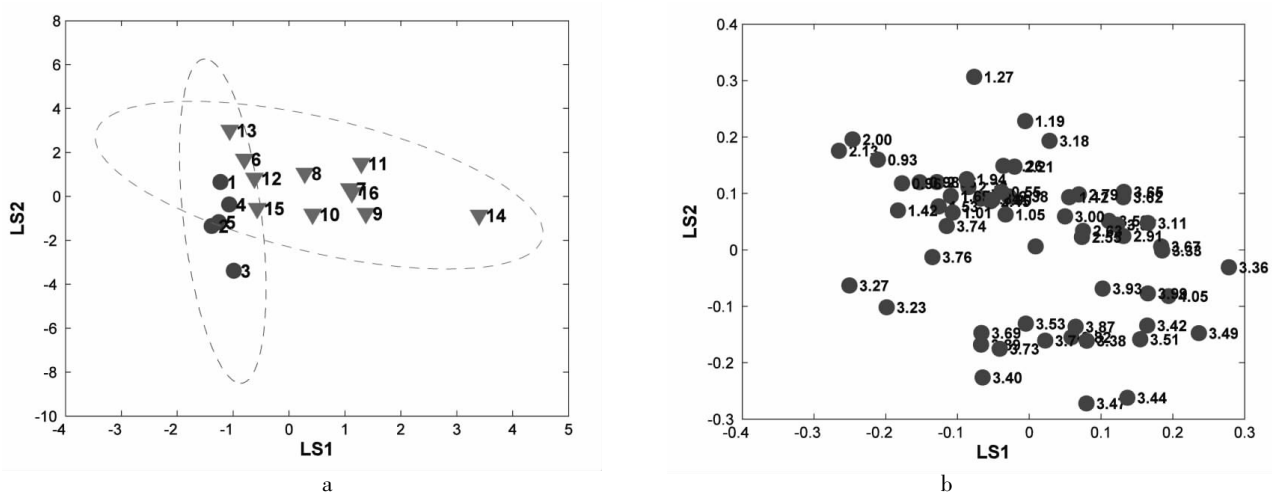
图3 模型对照组和肝豆灵加青霉素组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



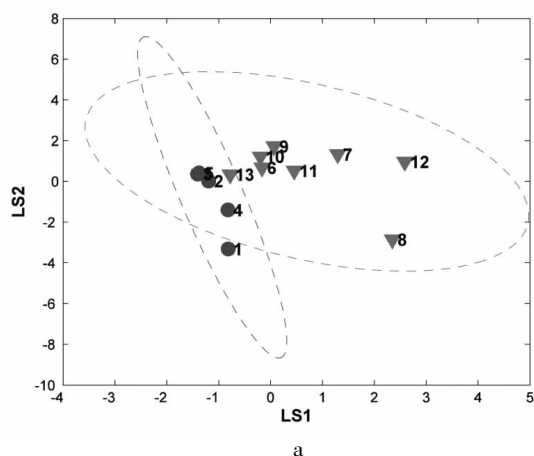
注: ▼模型对照组; ●肝豆灵组
图 4 模型对照组和肝豆灵组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



注: ●空白对照组; ▼模型对照组
图 5 空白对照组和模型对照组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)

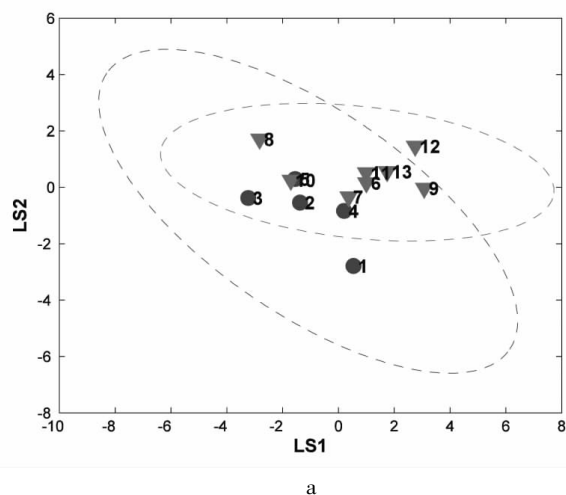
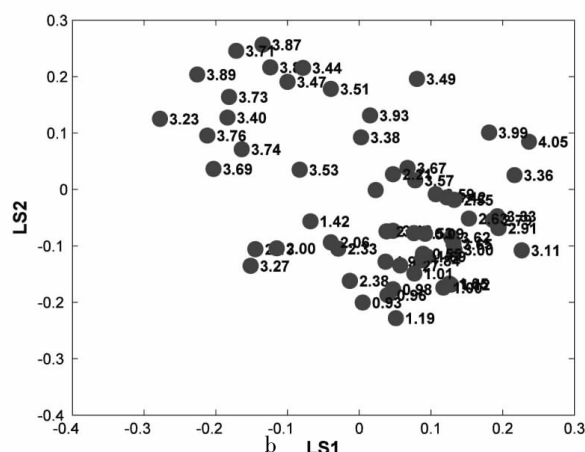


注: ▼铜模型对照组; ●青霉素组
图 6 模型对照组和青霉素组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



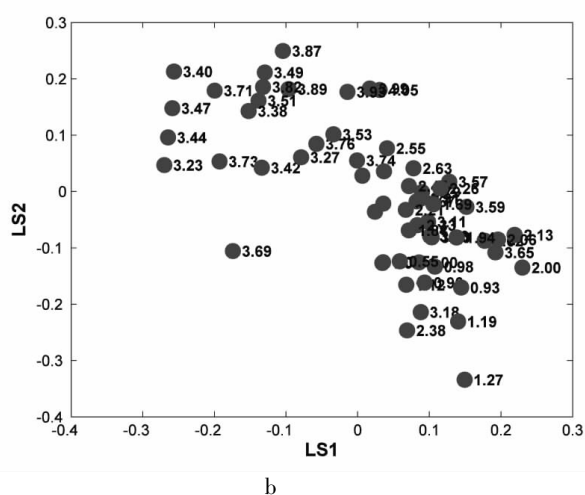
注: ▼模型对照组; ●肝豆灵加青霉胺组

图7 模型对照组和肝豆灵加青霉胺组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



注: ▼模型对照组; ●肝豆灵组

图8 模型对照组和肝豆灵组大鼠血清 PLS-DA 得分图 (a) 和负载图 (b)



氨酸、异亮氨酸、胆碱、葡萄糖、3-羟基丁酸的含量升高,糖蛋白、脂质、乳酸盐、丙酮酸盐的含量降低。

3 讨论

肝脏是机体物质代谢的中枢器官,体内许多物质合成、分解和转化等代谢过程都是在肝脏中进行的。肝脏发生肝纤维化改变时,肝小叶内炎性细胞、纤维细胞大量增生,使具有功能的肝实质细胞数量减少,影响了肝脏的物质代谢功能,出现肝功能、凝血功能等生化指标的异常^[5]。肝脏亦是人体内最大的代谢器官,具有特有的功能和某些酶系,肝病涉及多种激素、氨基酸、糖、脂质、蛋白质等代谢功能紊乱,因此,对肝脏和肝脏疾病进行代谢的系统研究尤为重要。由于WD为铜代谢障碍性疾病,氧化应激在铜引起细胞损伤中起重要作用,催化产生经自由基,使内源性的抗氧化作用减

弱,可引起细胞蛋白质、脂质和核酸的氧化损伤,发生小分子代谢物的变化^[6-7]。

肝豆灵以大黄、黄连为君药,大黄清热通肠,凉血解毒,逐瘀通经;黄连清热燥湿,泄火解毒;共奏解毒通腑、化瘀散结之功。金钱草利水通淋,清热解毒,散瘀消肿;丹参祛瘀止痛,凉血消痈,两药合用共为臣药,奏清热活血利水之功。姜黄破血行气,通经止痛,莪术破血行气止痛祛瘀,既可助君臣药消癥瘕痞块,又可防其寒凉太过,损伤正气。诸药合用共奏通腑利湿、化瘀散结之功。洪铭范等^[8]研究表明,以肝豆灵为主的综合治疗方法可促进WD患者肝硬化及肝功能的恢复。薛本春等^[9]认为,肝豆灵IV号联合短期驱铜治疗可能通过抑制组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)水平,提高基质金属蛋白酶-1(MMP-1)/TIMP-1的比值,而发挥抗肝纤维化作用。前期研究发现,肝豆灵与青霉胺合用对铜负荷大鼠有诱导肝星状

胞凋亡、干预肝纤维化的作用^[10]。

本实验运用代谢组学技术检测肝豆灵对铜负荷大鼠肝纤维化代谢标志物的影响,发现肝豆灵组血浆亮氨酸、异亮氨酸、胆碱、葡萄糖、3-羟基丁酸的含量升高、糖蛋白、脂质、乳酸盐、丙酮酸盐的含量降低,提示肝豆灵有调节氨基酸、糖、脂肪代谢的作用,可能修复神经细胞的凋亡,对铜过度沉积造成的代谢产物的异常有逆转的作用,而这种调节可能是多靶点、多途径的,既有对氨基酸、糖、脂肪代谢的干预,又有对性腺轴、神经细胞凋亡的调节作用。因此,肝豆灵对铜负荷大鼠分子代谢物有明显的调节效应,对 WD 肝纤维化的代谢异常有修复的作用。

参考文献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease [J]. Lancet, 2007, 369(9559): 397-408.
- [2] 李新华, 张欣欣. 肝豆状核变性诊疗进展 [J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(2): 222-229.
- [3] 李毓雯, 万小华, 宁琴, 等. 铜过量负荷导致肝细胞凋亡及其对 Bax/Bcl-2 基因表达的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 42-46.

- [4] 马红, 王雅静, 董继扬, 等. 基于核磁共振代谢组学对 2 型糖尿病合并脑梗死的研究 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(1): 63-68.
- [5] 刘树业, 段樱, 李娟. 代谢组学的进展及肝脏代谢组学 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 197-202.
- [6] Samuele A, Mangiagalli A, Armentero MT, et al. Oxidative stress and proapoptotic conditions in a rodent model of Wilson's disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1741(3): 325-330.
- [7] Pamp K, Bramey T, Kirsch M, et al. NAD(H) enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups [J]. Free Radic Res, 2005, 39(1): 31-40.
- [8] 洪铭范, 杨任民. 中西医结合治疗对 146 例肝豆状核变性患者肝硬变及肝功能的改善作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(12): 890-892.
- [9] 薛本春, 杨任民, 胡纪源, 等. 肝豆灵 IV 号联合短期驱铜治疗对肝豆状核变性患者肝纤维化血清学指标的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 785-788.
- [10] 张娟, 鲍远程, 谢道俊, 等. 通腑利尿、化瘀散结方对铜负荷大鼠肝纤维化 p38MAPK 信号通路影响的研究 [J]. 中医临床杂志, 2012, 24(3): 280-282.

Effect of Gandouling on Serum Metabolomics of Liver Fibrosis in Copper-Loaded Rats

ZHANG Juan, BAO Yuancheng, XIE Daojun, TONG Jianbing, ZHOU Lei, YANG Bo, JIN Shan, SHEN Bin, DING Weijun

(First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Province 230031)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of Gandouling [tablets for Wilson's disease (WD)] for WD-induced liver fibrosis. **Methods** Totally 75 Wistar rats were randomized into the blank control group, model control group, Gandouling group, Gandouling combined with Penicillamine group, and Penicillamine group, with 15 in each. The copper-loaded rat models were copied for 12 weeks in all groups except the blank control group. The Gandouling group was gavaged with 0.486 g/(kg · d) of Gandouling, the Penicillamine group was gavaged with 0.09 g/(kg · d) of Penicillamine, and the Gandouling combined with Penicillamine group was gavaged with 0.486 g/(kg · d) of Gandouling and 0.09 g/(kg · d) Penicillamine once daily from the 7th week to the 13th week. The serum specimens were taken and the small molecule makers of liver fibrosis were detected with metabolomic techniques. **Results** Gandouling could increase the contents of leucine, isoleucine, choline, glucose and 3-hydroxybutyric acid, and decrease the contents of glycoproteins, lipids, lactate and pyruvate in copper-loaded rats. **Conclusion** Gandouling can regulate small molecule metabolites in copper-loaded rats and repair metabolic abnormalities, which maybe one of the mechanisms for WD.

Keywords Wilson's disease (WD); liver fibrosis; Gandouling; metabolomics

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(收稿日期: 2013-09-29; 修回日期: 2013-11-12)

编辑: 邓 媛