

基于脂类代谢组学研究对乙酰氨基酚对小鼠药物性肝损伤的早期毒性[△]

杨虹^{1*}, 彭芳¹, 刘刚², 时京珍¹, 钱海兵^{3#} (1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州中医药大学科研处, 贵阳 550002; 3. 贵州中医药大学教务处, 贵阳 550002)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)15-2031-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.15.04

摘要 目的: 基于脂类代谢组学研究对乙酰氨基酚(APAP)对小鼠的早期肝损伤毒性, 为寻找潜在生物标志物提供参考。方法: 将20只小鼠随机分为正常组和APAP肝损伤组, 每组10只。APAP肝损伤组小鼠腹腔注射APAP 300 mg/kg建立急性肝损伤模型, 正常组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。1 h后取血并分离血浆, 采用超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF-MS)法检测小鼠血浆代谢产物进行代谢组学分析, 采用主成分分析(PCA)、偏最小二乘法分析(PLS-DA)以及正交偏二乘法分析(OPLS-DA)区分组间代谢轮廓的整体差异, 并根据HMDB、Metlin、LIPID MAPS数据库对脂类代谢物进行筛选和鉴定, 同时检测小鼠血浆中APAP水平变化。认定OPLS-DA分析中变量权重值(VIP)大于1且 $P < 0.05$ 的脂类代谢物为差异代谢物, 并将脂类差异代谢物与血浆中APAP水平进行相关性分析。结果: PCA、PLS-DA以及OPLS-DA结果显示, 正常组和APAP肝损伤组样品点位于图形不同的区域, 具有良好的区分度。APAP肝损伤组与正常组比较, 血浆中5个脂肪酰类代谢产物水平出现显著的升高或降低, 8个甘油磷脂类代谢产物水平均显著降低, 1个鞘脂类代谢产物水平显著上升; 9-硫杂硬脂酸、十四烷二酸、9-过氧化氢-10, 12-十八碳二烯酸、L-肉豆蔻酰基肉碱(脂肪酰类)和Scyphostatin A(鞘脂类)水平与血浆中APAP水平显著相关。结论: APAP染毒1 h后血浆脂类代谢组学显示异常, 共发现14个相关脂类差异代谢物, 其中5个与血浆中APAP水平显著相关。

关键词 对乙酰氨基酚; 药物性肝损伤; 脂类代谢组学; 生物标志物; 小鼠; 早期毒性

Study on Early Toxicity of Paracetamol to Drug-induced Liver Injury in Mice Based on Lipid Metabonomics Research

YANG Hong¹, PENG Fang¹, LIU Gang², SHI Jingzhen¹, QIAN Haibing³ (1. College of Basic Medicine, Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China; 2. Dept. of Academic Research, Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China; 3. Dept. of Educational Administration, Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study early toxicity of paracetamol (APAP) to drug-induced liver injury in mice based on lipid metabonomics research, and to provide reference for finding potential biological marker. METHODS: Totally 20 mice were randomly divided into normal group and APAP liver injury group, with 10 mice in each group. APAP liver injury group was given intraperitoneal injection of APAP 300 mg/kg to establish acute liver injury model; normal group was given constant volume of normal saline intraperitoneally. 1 h later, the blood of mice was collected to isolate plasma. UPLC-Triple-TOF-MS method was used to detect plasma metabolites and perform metabonomics analysis. PCA, PLS-DA and OPLS-DA analysis distinguished the difference of metabolism profiles between groups. The lipid metabolites were screened and identified according to HMDB, Metlin and LIPID MAPS databases. Meanwhile, the changes of APAP level in plasma of mice were detected. The lipid metabolites with

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81860700, No.81860873, No.81460640); 贵州省科技计划项目(No.黔科合LH字[2016]7122号), No.黔科合SY[2010]3016号); 贵州省普通高等学校特色重点实验室(No.黔教合KY字[2017]006); 贵州省国内一流学科建设重点项目(中药学)(No. GNYL[2017]008号); 贵州中医学院科研项目(No.3040-040170106)

* 助教, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 0851-88233004。E-mail: caroline198@foxmail.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药理学。电话: 0851-88233040。E-mail: 279753407@qq.com

variable influence in the projection (VIP) greater than 1 and $P < 0.05$ in OPLS-DA analysis were identified as differential metabolites. The correlation between lipid differential metabolites and plasma APAP level was analyzed. RESULTS: PCA, PLS-DA and OPLS-DA results showed that sample points in normal group and APAP liver injury group were located in different areas with good differentiation. Compared with liver injury group and normal group, levels of 5 fatty acid metabolites were significantly increased or decreased;

levels of 8 glycerophospholipids were significantly decreased and one sphingolipids was significantly increased. 9-thiastearic acid, tetradecanedioic acid, 9-hydrogen peroxide-10, 12-octadecadienoic acid, *L*-myristoyl carnitine (fatty acid) and scyphostation A (sphingolipids) levels had a significant correlation with APAP level in plasma. CONCLUSIONS: The plasma lipid metabolomics showed abnormal changes 1 hour after acetaminophen exposure. A total of 14 related lipid differential metabolites are found, and 5 of which are significantly correlated with APAP level in plasma.

KEYWORDS Paracetamol; Drug-induced liver injury; Lipid metabolomics; Biomarker; Mice; Early toxicity

我国是药物性肝损伤(Drug-induced liver injury, DILI)的高发国家,每年发生率至少为23.80/10万人^[1]。对乙酰氨基酚(APAP)是常见的复方抗感冒药成分,也是导致DILI的常见药物,由过量APAP导致的肝损伤发生机制复杂,涉及毒性产物生成、氧化应激、线粒体损伤以及炎症反应等病理生理过程^[2]。目前,临床对DILI的诊断仍有很多不足,传统检测指标如谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)等存在敏感性低、特异性差的特点^[3],尚未找到理想的DILI生物标志物。

系统生物学方法为研究疾病发生机制提供了新的可能。目前,采用蛋白质组学、基因组学等方法发现,miR-122、miR-155、谷氨酸脱氢酶等在DILI的诊断方面具有较高的价值^[4-5]。但最新版《药物性肝损伤诊治指南》(2015年版)指出,新生物标志物在DILI诊断中的贡献还有待进一步研究^[6]。代谢组学是系统生物学领域继基因组学、蛋白质组学后诞生的新兴学科,脂类代谢组学是代谢组学的重要分支,用以描绘机体特定状态下脂类代谢的整体轮廓。肝脏是人体最大的代谢器官,在脂类化合物的消化、吸收、合成、分解、运输过程中发挥着重要作用,通过对脂类代谢轮廓的描述可以反映肝脏所处的病理生理状态。而通过前期研究发现,以文献报道的肝损伤剂量(300 mg/kg)^[6]给小鼠使用APAP后1 h可发现肝中还原型谷胱甘肽(GSH)水平显著降低,说明在该观察点APAP肝损伤已经启动。鉴于此,本研究以文献报道的肝损伤剂量腹腔注射给予小鼠APAP,并用超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Triple-TOF-MS)研究APAP给药1 h后小鼠血浆中脂类代谢组学的改变情况,以期发现与APAP导致急性肝损伤发生发展过程相关的差异代谢物,为肝损伤的机制研究及发现早期肝损伤潜在生物标志物提供一定的研究基础。

1 材料

1.1 仪器

5600 UPLC-Triple-TOF-MS系统(美国AB Sciex公司);EG1150石蜡包埋机、RM2245轮转式切片机(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

对乙酰氨基酚标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:S31044,纯度:99%);甲醇、甲酸为质谱纯,均

购自美国Fisher Chemical公司。

1.3 动物

SPF级BALB/c小鼠20只,♂,18~22 g,购于长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)-2014-0011。

2 方法

2.1 分组与给药

小鼠于遵义基础药理教育部重点实验室SPF级动物房中适应性饲养1周后,随机分为正常组和APAP肝损伤组。APAP肝损伤组小鼠于4:00 p.m.—5:00 p.m.一次性腹腔注射APAP(300 mg/kg),正常组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水。

2.2 血样采集及处理

小鼠均于腹腔注射后1 h取血,将血样置于肝素抗凝管中,立即缓慢摇匀,静置1 h,然后以3 000 r/min离心10 min,取上清液,即得小鼠血浆。

2.3 UPLC-Triple-TOF-MS法检测小鼠血浆中代谢产物

2.3.1 色谱条件 色谱柱为BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈-异丙醇(1:1, V/V)溶液(含0.1%甲酸),梯度洗脱;流速为0.4 mL/min;进样量为20 μL,柱温为40 ℃。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	100	0
3	80	20
9	40	60
11	0	100
13	0	100
13.1	100	0
16	100	0

2.3.2 质谱条件 样品质谱信号采集分别采用正、负离子扫描模式,电喷雾离子源(ESI),电喷雾毛细管电压、进样电压和碰撞电压分别为1.0 kV、40 V和6 eV,离子源温度和去溶剂温度分别为120、500 ℃,载气流量为900 L/h,质谱扫描范围为质荷比(*m/z*)50~1 000,分辨率为30 000。

2.3.3 样品制备与检测 取小鼠血浆样品100 μL,加入400 μL甲醇-乙腈(1:1, V/V)溶液,混匀,冰上超声(功率:300 W,频率:40 kHz)萃取2次,每次15 min;然后将

样品置于-20℃条件下静置30 min,再在4℃条件下以13 000×g离心15 min,取上清液,抽干;用乙腈-水(1:1, V/V)溶液复溶至100 μL,备用。按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样分析。

2.4 数据采集与分析

2.4.1 代谢物的搜库鉴定 质谱数据用代谢组学处理软件Progenesis QI V2.4进行搜库鉴定,将MS和MS/MS信息,包括代谢物的精确分子量、保留时间等与代谢数据库进行匹配。主要鉴定数据库为人类代谢组数据库(The human metabolome database, HMDB), Metlin 代谢组数据库(Metlin metabolite database, 简称“Metlin”)以及脂类图谱数据库(LIPID MAPS databases)。

2.4.2 主成分分析(PCA) 质谱数据经代谢组学处理软件progenesis QI V2.4进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化处理,最终得到一个保留时间、*m/z*和峰强度的数据矩阵。将归一化后的数据矩阵导入SIMCA-P+14.0进行分析。采用无监督的PCA来观察各样本之间的总体分布和整体分析过程的稳定性,模型参数 R^2X 表示所有主成分对变量的累积解释率,数值越接近1说明模型拟合准确性越好。

2.4.3 偏最小二乘法分析(PLS-DA)及正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA) 用有监督的PLS-DA及OPLS-DA来区分各组间代谢轮廓的整体差异。PLS-DA是一种有监督的分析方法,把各组分门别类,有利于发现组间的异同点。OPLS-DA是PLS-DA的衍生算法,进一步对不相关数据进行排除,可以更好地区分组间差异,提高模型的有效性和解析能力。评价模型的参数有 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 ,其中 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力,这3个指标越接近于1时表示模型越稳定可靠,一般 $Q^2 > 0.5$ 表示模型的预测能力较好。

2.4.4 脂类差异代谢物的分析 筛选OPLS-DA结果中变量重要性投影(Variable influence in the projection, VIP) > 1和student *t*检验中 $P < 0.05$ 的脂类代谢物为两组比较的脂类差异代谢物^[7],差异倍数(Fold change, FC) = 正常组差异代谢物峰强度/APAP肝损伤组差异代谢物峰强度。根据该化合物的色谱响应强度(峰高、峰面积),对脂类差异代谢物和APAP进行相对定量分析^[7]。并使用R语言,将所得脂类差异代谢物与APAP水平进行相关性分析,得到相关性系数 r 和 P 值, $P < 0.05$ 认为该脂类差异代谢物与APAP的水平显著相关。

3 结果

3.1 UPLC-Triple-TOF-MS 谱图分析结果

在该检测条件下,代谢物分离情况良好,两种离子检测模式具有很好的互补性,各成分的保留时间均在15 min以内,正常组和APAP肝损伤组样品总离子流

图有一定区别。总离子流图见图1。

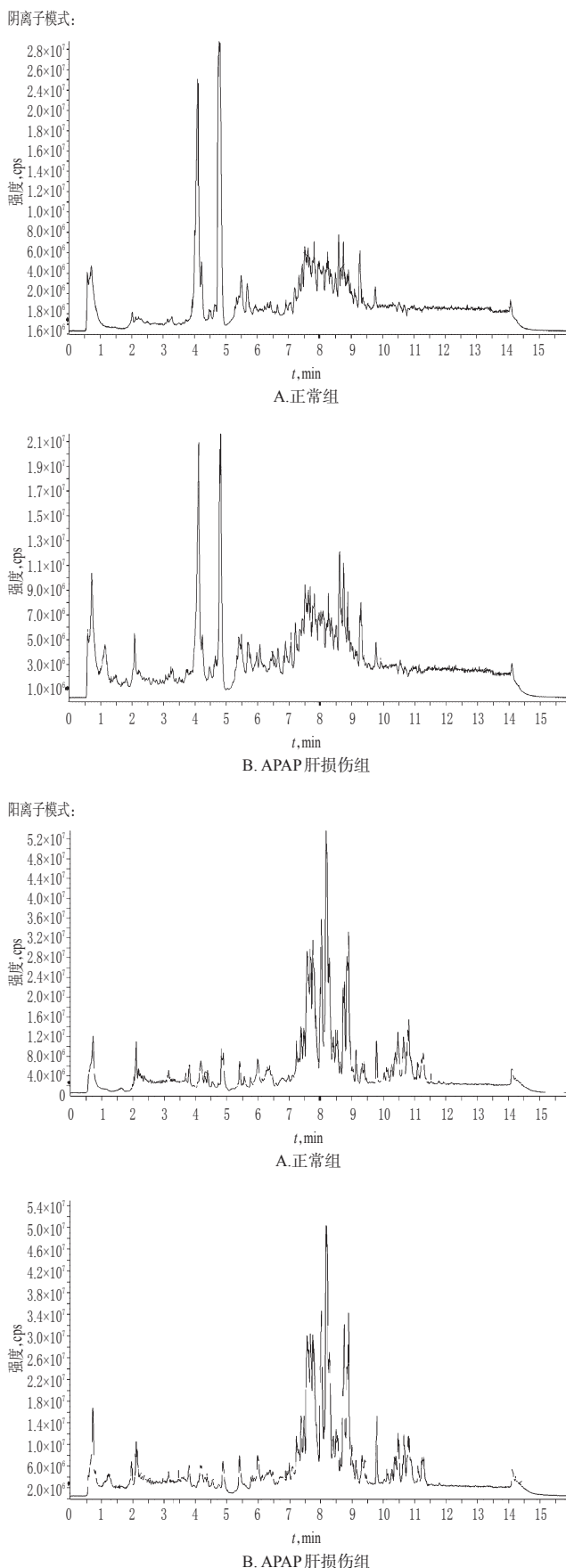


图1 总离子流图

Fig 1 TIC diagrams

3.2 PCA分析结果

本模型拟合参数 R^2X 为0.787,说明建模理想。从PCA分析的散点图中可以看出,正常组和APAP肝损伤组的样品点分布在图中不同的象限,说明正常组和APAP肝损伤组小鼠血浆中整体代谢轮廓有很好的区分。结果见图2。

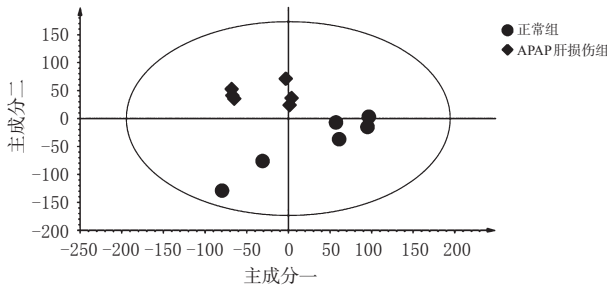


图2 PCA分析图

Fig 2 Plot of PCA analysis

3.3 PLS-DA、OPLS-DA分析结果

在本研究的分析过程中,选择3个主成分作为最终建模所需数目,对应的 R^2Y 和 Q^2 数据如下:在PLS-DA分析中 $R^2X=0.753, R^2Y=0.987, Q^2=0.879$;在OPLS-DA分析中 $R^2X=0.753, R^2Y=0.987, Q^2=0.905$,说明建模情况良好。从两种分析图中可以看出,正常组和APAP肝损伤组各个样品点分布于图形不同的区域,具有良好的区分度,说明正常组和APAP肝损伤组小鼠血浆中整体代谢轮廓存在明显差异。PLS-DA和OPLS-DA分析图见图3。

3.4 脂类差异代谢物分析结果

APAP肝损伤组与正常组比较,共发现14个脂类差异代谢物,包括脂肪酰类(5个)、甘油磷脂类(8个)、鞘脂类化合物(1个)。且与正常组比较,APAP肝损伤组小鼠

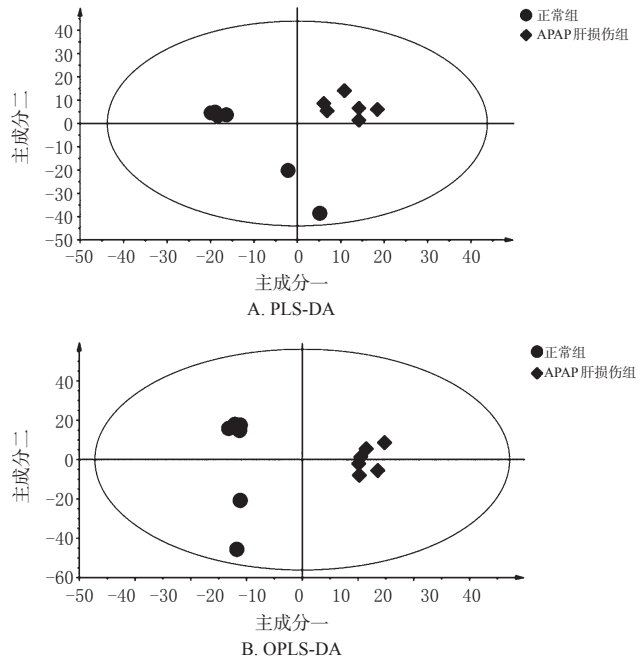


图3 PLS-DA和OPLS-DA分析图

Fig 3 Plots of PLS-DA and OPLS-DA analysis

血浆中8个甘油磷脂类化合物和5,8,12-三羟基-9-十八碳烯酸、9-硫杂硬脂酸(脂肪酰类)水平显著降低($P<0.05$),9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸、十四烷二酸、L-肉豆蔻酰基肉碱(脂肪酰类)和Scyphostatin A(鞘脂类)水平显著升高($P<0.05$)。相关性分析结果显示,与血浆APAP水平[强度为(4.155 ± 3.978)]显著相关的脂类差异代谢物5个,分别为9-硫杂硬脂酸、十四烷二酸、9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸、Scyphostatin A、L-肉豆蔻酰基肉碱(r 分别为-0.708、0.579、0.612、0.736、0.928, P 均 <0.05)。脂类差异代谢物鉴定信息见表1,脂类差异代谢物的相对表达结果见表2。

表1 脂类差异代谢物鉴定信息

Tab 1 Lipid differential metabolites identification

分类	大类	脂类差异代谢物	分子式	m/z	保留时间, min
脂肪酰类	十八烷酸	9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸	$C_{18}H_{32}O_4$	311.222, 295.232, 277.224, 151.112, 91.066	7.219
		脂肪酰及共轭物	十四烷二酸	$C_{14}H_{26}O_4$	257.176, 279.173, 239.172, 195.171
	脂肪酰酯	5,8,12-三羟基-9-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_5$	331.248, 295.232, 113.091, 69.073, 43.051	5.396
		9-硫杂硬脂酸	$C_{17}H_{32}O_5S$	303.232, 131.092, 119.093, 91.062, 81.071	7.472
		L-肉豆蔻酰基肉碱	$C_{13}H_{24}NO_4$	372.311, 313.242, 85.035, 60.086	6.943
甘油磷脂类	磷脂酰乙醇胺	PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0)	$C_{53}H_{96}NO_8P$	504.309, 363.292, 262.423, 44.049	7.957
		LysoPE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	$C_{52}H_{94}NO_8P$	502.293, 441.243, 361.269, 287.243, 269.237, 98.990	7.799
		LysoPE(20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)	$C_{52}H_{94}NO_8P$	504.309, 486.302, 443.258, 363.295, 289.253, 271.255	8.083
		PE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	$C_{53}H_{92}NO_8P$	500.277, 359.268, 91.063, 131.092, 119.091	7.323
		PE(18:1(9Z)/0:0)	$C_{45}H_{84}NO_8P$	480.309, 462.305, 339.295, 308.303, 62.068	8.364
		LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	$C_{44}H_{82}NO_8P$	478.293, 460.284, 337.273, 263.245, 155.017	7.848
		PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	$C_{57}H_{102}NO_8P$	526.293, 508.288, 385.274, 311.243, 293.232, 98.991	7.658
		磷脂酰丝氨酸	PS(MonoMe(11,5)/DiMe(13,5))	$C_{41}H_{80}NO_{12}P$	480.801, 960.626, 943.576, 103.063, 73.032
鞘脂类	鞘氨醇碱	Scyphostatin A	$C_{31}H_{56}NO_5$	512.335, 534.331, 494.330, 184.073	5.810

4 讨论

APAP诱导的急性肝损伤模型是常用的药物性肝损

伤模型,以过量APAP造模16 h后可出现明显的ALT含量显著升高,以及肝脏病理损伤^[8]。课题前期对过量

表2 脂类差异代谢物的相对表达结果

Tab 2 Relative expression results of lipid different metabolites

脂类差异代谢物	强度, cps		VIP	P	FC
	正常组	APAP肝损伤组			
9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸	0.378 ± 0.121	1.205 ± 0.814	5.592	0.034	0.314
十四烷二酸	0.073 ± 0.024	0.465 ± 0.429	3.790	0.040	0.156
5,8,12-三羟基-9-十八碳烯酸	0.131 ± 0.018	0.103 ± 0.011	1.031	0.008	1.273
9-硫杂硬脂酸	0.671 ± 0.240	0.249 ± 0.178	4.236	0.006	2.697
L-肉豆蔻酰基肉碱	0.759 ± 0.128	1.462 ± 0.550	5.394	0.012	0.519
PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0)	0.093 ± 0.010	0.070 ± 0.013	1.021	0.007	1.330
LysoPE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	1.770 ± 0.275	1.396 ± 0.206	3.925	0.024	1.268
LysoPE(20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)	0.912 ± 0.177	0.787 ± 0.042	2.139	0.033	1.159
PE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	0.922 ± 0.090	0.679 ± 0.087	3.466	0.001	1.358
PE(18:1(9Z)/0:0)	3.370 ± 0.277	2.163 ± 0.183	6.195	0.000	1.290
LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	9.702 ± 2.222	7.030 ± 0.801	10.06	0.020	1.380
PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	4.170 ± 0.976	2.773 ± 0.220	7.742	0.007	1.504
PS(MonoMe(11,5)/DiMe(13,5))	0.211 ± 0.041	0.167 ± 0.022	1.235	0.043	1.263
Scyphostatin A	0.384 ± 0.098	0.712 ± 0.120	3.930	0.000	0.540

APAP造模后1 h的时间点进行了研究,此时ALT含量并未升高,也未出现明显的病理改变,但肝组织中GSH含量显著下降,而GSH是体内重要的抗氧化物质,也是APAP毒性代谢物的关键解毒物质。该结果说明,APAP造模后1 h机体抗氧化能力显著下降,APAP肝毒性已经启动。在肝毒性的启动阶段,机体势必通过发生一系列的变化逐步加重肝损伤。通过系统生物学手段可以揭示机体发生在组织改变之前的整体变化,是目前快速寻找生物标志物的常用手段^[9]。目前,通过蛋白质组学的研究方法,Thulin P等^[10]发现在转氨酶升高之前,角蛋白18(K18)已经开始明显上升,较ALT对肝损伤更为敏感。Antoine DJ等^[11]发现高速泳动族蛋白1(HMG1)也可在转氨酶升高之前明显升高。此类生物标志物与传统肝损伤标志物ALT相比,具有更快速、更敏感的特点,为DILI的早期诊断提供了新的可能。在代谢组学方面同样有研究发现,DILI早期可出现明显的代谢轮廓的改变,血浆的内源性代谢物会比血清生化参数对DILI的反应更为敏感^[12]。肝脏是人体最大的代谢器官,参与大部分内、外源性物质的代谢,也是脂类代谢的主要场所,有研究认为脂质过氧化过程是导致DILI的重要原因之一^[13]。本研究主要从脂类代谢的角度观察机体在给予肝损伤剂量APAP之后的变化。本研究以APAP造模后1 h这个时间点,观察小鼠血浆脂类代谢物的改变情况,以期发现与APAP造模相关的脂类差异代谢物,说明肝损伤的发生过程,并寻找有进一步研究价值的生物标志物,这可为药物性肝损伤的早期诊疗提供一定的理论帮助。

本研究发现,正常组和APAP肝损伤组小鼠血浆代谢物的整体轮廓存在明显差异,具有很好的区分度。共检出了14个脂类差异代谢物,包括脂肪酰类、甘油磷脂

类和鞘脂类。脂肪酰类包括5个差异代谢物。其中,9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸是一种亚油酸氧化产物,部分亚油酸可由脂氧合酶、环氧酶、P₄₅₀酶催化或者通过非酶促作用发生氧化反应。在针对非酒精性脂肪肝患者的血清脂质谱分析中发现,亚油酸氧化产物与肝组织病理(炎症、纤维化、脂肪变性)密切相关。非酒精性脂肪肝患者亚油酸氧化产物较肝脂肪变性患者明显增多^[14]。亚油酸氧化产物可增强肝脏Kupffer细胞肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达促进炎症反应^[15]。同时也可以增加过氧化物水平诱导肝细胞凋亡^[16]。在本研究中,肝损伤剂量APAP给药1 h后小鼠血浆中9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸水平明显升高,这很可能是肝脏损伤的不利信号。十四烷二酸是一种C14 α,ω -二羧酸,也是一种重要的脂肪酸氧化产物。在肝脏微粒体,脂肪酸的 ω 碳原子羟化生成 ω -羧脂肪酸,再进一步生成 α,ω -二羧酸,随后进入线粒体发生 β -氧化。同时二羧酸也是过氧化物酶体增殖剂激活受体的配体(PPAR α),参与调解肝内的脂肪代谢过程。有研究发现,在急性酒精性肝炎的患者血清中,二羧酸包括十四烷二酸水平显著升高^[17]。在本研究中,过量APAP给药后1 h,可以发现小鼠血浆中十四烷二酸水平显著升高。

在14个脂类差异代谢物中,8个属于甘油磷脂类。肝脏是血液中甘油磷脂的主要来源,甘油磷脂同样是肝细胞以及线粒体膜的重要组成部分,PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0)、LysoPE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)、LysoPE(20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)、PE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)、PE(18:1(9Z)/0:0)、LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)、PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)属于溶血磷脂酰乙醇胺或溶血磷脂,通常由磷脂酶A催化降解磷脂得到,也可来源于甘油一酯的磷酸化作用或者甘油磷脂的酰化作用。在不同的肝脏疾病中,溶血磷脂的变化并不一致。例如,与肝硬化患者相比,LysoPEs在肝癌细胞中表达明显增多^[18]。在自身免疫性肝炎的早期研究中显示,刀豆球蛋白A处理的小鼠LysoPEs明显下调^[19]。在本研究中,在APAP给药1 h后,小鼠血浆中溶血磷脂水平与正常组比较明显下降,与上述文献报道结果一致。PS(MonoMe(11,5)/DiMe(13,5))是一种磷脂酰丝氨酸,也是细胞膜的重要组成部分。APAP处理1 h时,小鼠血浆中PS(MonoMe(11,5)/DiMe(13,5))水平同样明显降低。膜磷脂水平降低,很可能反映了过量APAP对细胞膜或线粒体膜造成了影响。

将脂类差异代谢物水平与血浆中APAP水平进行相关性分析发现,9-硫杂硬脂酸、十四烷二酸、9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸、Scyphostatin A和L-肉豆蔻酰基肉碱均与APAP水平显著相关。

综上所述,本研究探讨了APAP肝损伤造模后1 h,转氨酶和组织损伤尚未出现之前血浆脂类代谢组学的变化,筛选与早期肝损伤相关的脂类差异代谢物。结果发现,7个溶血磷脂水平下降,反映了肝损伤剂量APAP对细胞膜结构和功能可能有影响;同时发现,APAP致肝损伤后,小鼠血浆中十四烷二酸、9-过氧化氢-10,12-十八碳二烯酸水平明显升高,且与APAP水平显著相关。该结果可为进一步的DILI机制研究及生物标志物研究提供理论支持。

参考文献

- [1] SHEN T, LIU YX, SHANG J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8):2230-2241.
- [2] 方安宁,严家来,徐德祥.对乙酰氨基酚诱导肝损伤的药物保护研究进展[J]. *湘南学院学报(医学版)*, 2017, 19(1):68-71.
- [3] 贺蕾艳,郭瑶雪,李春,等.药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. *药学学报*, 2015, 50(8):959-965.
- [4] GAO Y, CAO Z, YANG X, et al. Proteomic analysis of acetaminophen-induced hepatotoxicity and identification of heme oxygenase1 as a potential plasma biomarker of liver injury[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2016, 11(1/2):1-40.
- [5] HORNBY RJ, STARKEY LP, DEAR J, et al. MicroRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury: key current and future issues for translation to humans[J]. *Expert Rev Clin Phar*, 2014, 7(3):349-362.
- [6] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组.药物性肝损伤诊治指南[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(11):1752-1769.
- [7] 阿基业.代谢组学数据处理方法:主成分分析[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(5):481-489.
- [8] 杨宇莎,时京珍,雷钟,等.血人参乙酸乙酯部位对APAP诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(4):786-789.
- [9] 巫圣乾,张璐,龚梦鹃,等.黄独素B致小鼠急性肝损伤的代谢组学研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(22):3046-3050.
- [10] THULIN P, NORDAHL G, GRY M, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts[J]. *Liver Int*, 2014, 34(3):367-378.
- [11] ANTOINE DJ, DEAR JW, LEVIS PS, et al. Mechanistic biomarker provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital[J]. *Hepatology*, 2013, 58(2):777-787.
- [12] KIM JW, RYU SH, KIM S, et al. Pattern recognition analysis for hepatotoxicity induced by acetaminophen using plasma and urinary ¹H NMR-based metabolomics in humans[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(23):11326-11334.
- [13] YUAN L, KAPLOWITZ N. Mechanisms of drug-induced liver injury[J]. *Clinics in Liver Disease*, 2013, 17(4):507-518.
- [14] FELDSTEIN AE, LOPEZ R, TAMIMI TA, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(10):3046-3054.
- [15] BOHM T, BERGER H, NEJABAT M, et al. Food-derived peroxidized fatty acids may trigger hepatic inflammation: a novel hypothesis to explain steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(3):563-570.
- [16] ZHANG Y, XUE R, ZHANG Z, et al. Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells [J]. *Lipids Health Dis*, 2012, 11(1):563-570.
- [17] RACHAKONDA V, GABBERT C, RAINA A, et al. Serum metabolomic profiling in acute alcoholic hepatitis identifies multiple dysregulated pathways[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):1-24.
- [18] RESSOM HW, XIAO JF, TULI L, et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 743(20):90-100.
- [19] ZHOU C, JIA HM, LIU YT, et al. Metabolism of glycerophospholipid, bile acid and retinol are correlated with the early outcomes of autoimmune hepatitis[J]. *Mol Bio Syst*, 2016, 12(5):1574-1585.

(收稿日期:2019-04-17 修回日期:2019-06-12)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅