

## Z24 经口染毒大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究

王全军<sup>1</sup>, 颜贤忠<sup>2</sup>, 吴纯启<sup>1</sup>, 赵剑宇<sup>2</sup>, 余寿忠<sup>1</sup>, 袁本利<sup>1</sup>, 廖明阳<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 国家生物医学分析中心, 北京 100850)

**摘要:** 目的 研究 Z24 染毒大鼠尿液代谢组学的改变及其与组织病理和血液生化指标的相关性, 探讨代谢组学在药物毒性早期筛选中的应用。方法 Wistar 大鼠连续经口给予 Z24 60, 130 及 200 mg·kg<sup>-1</sup>, 连续 5 d 后收集 24 h 尿液, 测定核磁共振 (<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 Z24 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠血浆谷丙转氨酶、谷草转氨酶和总胆红素分别升高 148%, 140% 和 110%; 130 和 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组均有不同程度的肝脏炎症和坏死。 [<sup>1</sup>H] NMR 谱主成分分析发现各组在不同染毒条件下的代谢状态可相互区分, 与肝脏病理和血浆生化改变相一致。结论 大鼠尿液 [<sup>1</sup>H] NMR 代谢谱与 Z24 毒性作用强度密切相关, 代谢组学分析是一种有良好发展前景的体内药物毒性早期筛选的方法。

**关键词:** 代谢组学; 核磁共振; 模式识别; 毒性; Z24

中图分类号: R965.3, R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)06-0460-06

近年来, 国外生物医学研究的热点之一是从全局观点分析生物体在生理、病理、药理及毒理状态下发生的各种动态变化; 并形成了以基因组学, 蛋白质组学及代谢组学<sup>[1]</sup>为代表的现代“组学”分析技术。其中代谢组学利用核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 液相色谱-质谱联用技术 (liquid chro-

matograph-mass spectrography, LC-MS) 等方法测定生物体液 (尿<sup>[2]</sup>、血<sup>[3]</sup>) 和组织提取液中的内源性代谢产物, 通过模式识别分析<sup>[4]</sup> 确定动物在各种状态下的代谢表型, 以代谢表型与数据库比较分析确定化学物作用的靶器官、发病机制及生物标志物。代谢组学在药物研究中主要应用于药物代谢、药物毒性筛选和作用机制研究<sup>[5]</sup>。

Z24 为一结构全新的抗肿瘤药物, 其主要作用靶点为血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 Bcl-2 蛋白。本实验室的初步研究表明 Z24 对啮齿类动物具有一定的肝脏毒性。目前, 国内尚未见有关代谢组学研究药物毒性的报道。本研究以 Z24 为代表型候选药物, 研究 Z24 染毒后大鼠尿液代谢表型的变化, 探讨代谢组学在药物毒理研究中的应用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物、试剂和仪器

Wistar 大鼠, ♀, 体重 240~260 g, 由军事医学科学院动物中心提供。室温为 25~27℃, 动物自由摄食饮水。1-(*N*-哌啶亚甲基)-3-(2'-吡咯甲基)-2-吡啶酮甲磺酸盐 [1-(*N*-piperidylmethylene)-3-(2'-pyrrolemethylene)-2-molindonemethanesulfonate], 代号: Z24, 由军事医学科学院毒物药物研究所合成 (专利号: CN1365972), 纯度 > 99.8%。重水 (deuterium oxide, D<sub>2</sub>O) 购自北京京巨化工科贸有限责任公司, 2,2,3,3, 三甲基甲硅烷基丙酸 [3-(trimethylsilyl)[2,2,3,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] propionate, TSP] 购自加拿大默克公司。Varian UNITYINOVA 600 型超导傅立叶变换 NMR 仪, 购自美国瓦里安公司。7020 型全自动生化分析仪购自日本日立公司。

#### 1.2 方法

20 只动物, 随机分为对照组 (注射用生理盐水) 和 Z24 60, 130, 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 4 组。每日灌胃给药 1 次, 连续 5 d。停药后, 用代谢笼收集 24 h 尿液, 存于接尿管 (内加 100 μL 浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的叠氮

收稿日期: 2004-01-12 接受日期: 2004-08-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 基金资助项目 (2002AA2Z342D)

作者简介: 王全军 (1976-), 男, 山东省阳谷人, 博士, 主要从事药物毒理学研究, 廖明阳 (1950-), 男, 湖南省衡山人, 研究员, 主要从事药物毒理学和新药评价研究。

\* 联系作者 E-mail: liaomingy@hotmail.com Tel: (010) 66931628

钠)中,置于冰中保持低温。实验结束后处死动物进行血液生化检测和组织病理学检查。

### 1.3 尿液收集和处理

尿液样品于 4℃, 3000 × *g* 离心 10 min, 取上清液加入 1:2 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), 静置 10 min。再于 4℃, 13 000 × *g* 离心 10 min, 取上清液加入适量 D<sub>2</sub>O 和 TSP, 用 Varian UNITYINOVA 600 型超导傅立叶变换 NMR 仪进行测量。

### 1.4 血浆生物化学分析

动物麻醉后心脏采血, 肝素钠抗凝, 3000 × *g* 离心 15 min, 收集血浆, 测定以下血浆生化指标: 谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT)、碱性磷酸酶 (ALP)、肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN)、肌酸激酶 (CK)、血清白蛋白 (Alb)、血糖 (Glu) 和总胆红素 (TBIL)。以英国 RANDOX 定值质控血清控制检查质量。数据经 SPSS 8.0 统计软件进行单因素方差分析。

### 1.5 肝脏病理学检查

给药结束 24 h 后, 处死大鼠, 取出肝脏, 生理盐水洗净, 常规切片、HE 染色作光镜观察。

### 1.6 NMR 数据采集和分析

在超导傅立叶变换 NMR 仪上调用 NOE 相关 2D-NMR 谱 (nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY) 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 0.15 s, 谱宽 7000 Hz, 采样点数

64 k, 叠加次数 128 次, 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 NMR 谱图。以 TSP 为化学位移参考峰的位置, 设为 0 ppm。调用 VNMR 中的程序将 <sup>1</sup>H 谱按默认值, 从 9.5 ppm 到 0.5 ppm, 每段为 0.04 ppm, 把 Z24 及其代谢产物所在的峰谱位移 4.57 ppm, 3.2 ppm, 2.5 ppm, 6.0 ~ 10.0 ppm 和水峰、脲素类活性氢所在的位移 4.5 ~ 6.2 ppm 去除进行分段并积分。将积分数据归一化之后, 以文本文件或 Excel 文件贮存, 用于主成分分析 (principal components analysis, PCA)。

### 1.7 主成分分析

将积分值进行中心化和比例换算, 用 Simca-P 10.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden) 软件进行 PCA<sup>[6]</sup>, 求出主成分 (principal components, PC), 利用 PC 对各组大鼠尿液的代谢组进行分析。

## 2 结果

### 2.1 血浆生化分析

从表 1 结果可知, 与对照组相比, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组的部分血液生化指标明显改变, GPT, GOT 和 TBIL 分别升高了 148%, 140% 和 110%。130 和 60 mg·kg<sup>-1</sup> 组的 GOT 及 TBIL 两指标有改变。说明 Z24 在高剂量下引起了明显肝脏毒性。

Tab 1. Effect of Z24 on liver

Parameter	Content or activity			
	Control	60	130	200(mg·kg <sup>-1</sup> )
GPT/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	25.6 ± 2.9	36.2 ± 4.6	34 ± 3.9	63.6 ± 10.7 *
GOT/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	51.4 ± 13.4	113 ± 25 *	89 ± 8.5	123 ± 12 *
ALP/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	199 ± 17	214 ± 27	198 ± 6.8	245 ± 12
BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	8.4 ± 0.4	8.3 ± 0.2	8.2 ± 0.2	7.9 ± 0.4
Cr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24.8 ± 1.3	26.9 ± 1.9	29.6 ± 2.4	26.2 ± 0.9
CK/g·L <sup>-1</sup>	265 ± 43	431 ± 124	423 ± 66	444 ± 62
TBIL/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.3	5.9 ± 0.4 *	8.1 ± 0.8 *
Alb/g·L <sup>-1</sup>	35.7 ± 0.3	35.2 ± 0.5	36.2 ± 0.2	34.5 ± 0.9
Glu/mmol·L <sup>-1</sup>	8.1 ± 0.4	7.3 ± 0.3	8.3 ± 0.4	8.7 ± 0.2

GPT: glutamate-pyruvate transaminase; GOT: glutamine oxaloacetic transaminase; ALP: alkaline phosphatase; BUN: blood urea nitrogen; Cr: creatinine; CK: creatine kinase; TBIL: total bilirubin; Alb: albumin; Glu: glucose.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control.

## 2.2 肝脏组织病理学检查

从图 1A 看出,  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组动物肝汇管区呈明显散在坏死性病变, 细胞结构破坏, 严重脂肪变性和大量空泡变, 淋巴细胞浸润, 组织纤维化, 胆管增生。  $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组动物肝汇管区出现炎症, 细胞质致密, 有散在空泡变性(图 1B)。  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组动物肝脏仅血管上皮细胞发生轻度炎症变化, 个别空泡变, 未见其他明显的毒性病理改变(图 1C)。对照组动物肝脏无任何病理改变(图 1D)。

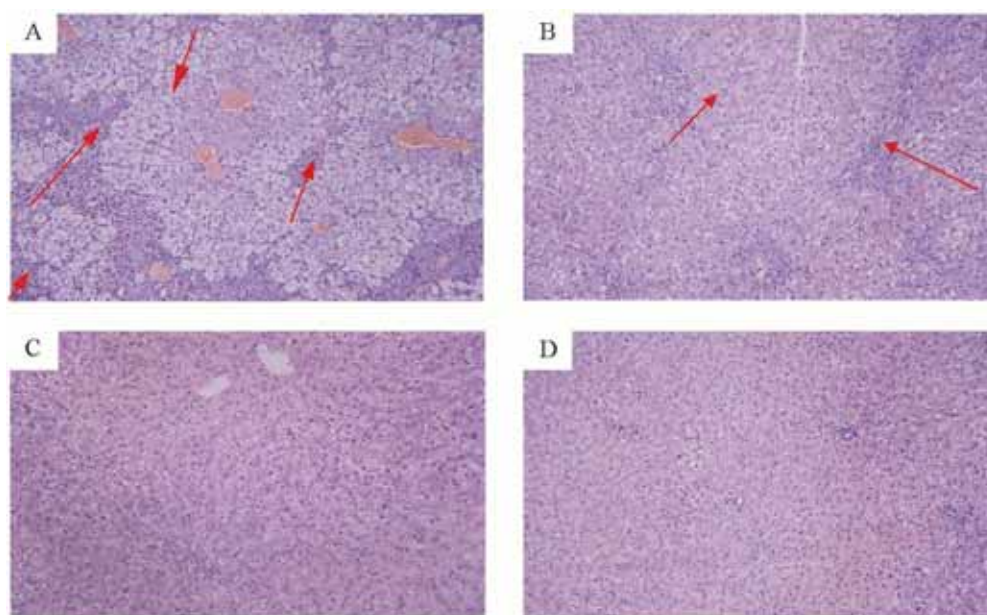
## 2.3 $^1\text{H}$ NMR 图谱及模式识别分析

4 个处理组动物尿液的典型  $^1\text{H}$  NMR 谱如图 2 所示, 对 20 只动物尿液  $^1\text{H}$  NMR 谱的波峰积分值的 PCA 结果见图 3。由图 2 可见主成分积分值集中于椭圆形散点图(95% 置信区内)的 4 个区域, 各剂量组与对照组间无明显交叉和重叠; 高剂量组集中分布在右方, 而对照组集中分布在左方, 各组的相对位置与给药剂量相对应。对  $^1\text{H}$  NMR 谱变化值影响最大的两个主成分的贡献率分别约为 72% (PC1) 和 26% (PC2)。对 PC1 和 PC2 的进一步分析表明, 与对照组相比, 中、高剂量组动物尿液中乳酸 (1.34 ppm)、柠檬酸 (2.68 ppm)、甲基胍 (2.84 ppm)、琥珀酸 (2.44 ppm)、苹果酸 (2.4 ppm)、己二酸 (1.68 ppm) 的谱峰相对积分面积明显增高而顺乌头

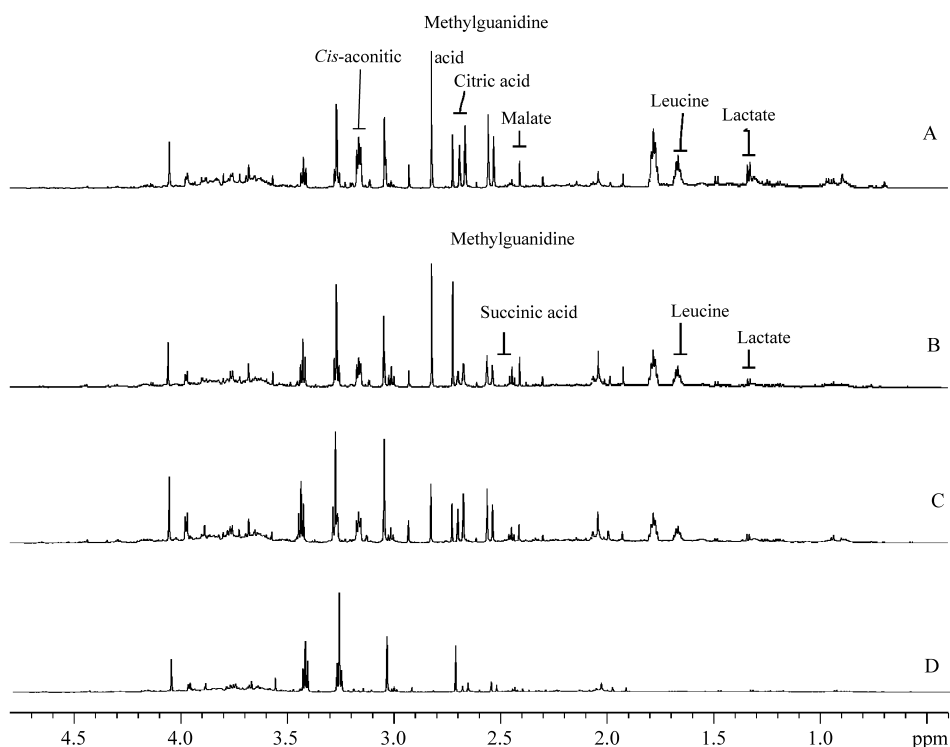
酸 (3.16 ppm) 的谱峰相对积分面积则明显下降(表 2, 图 2, 图 4)。

## 3 讨论

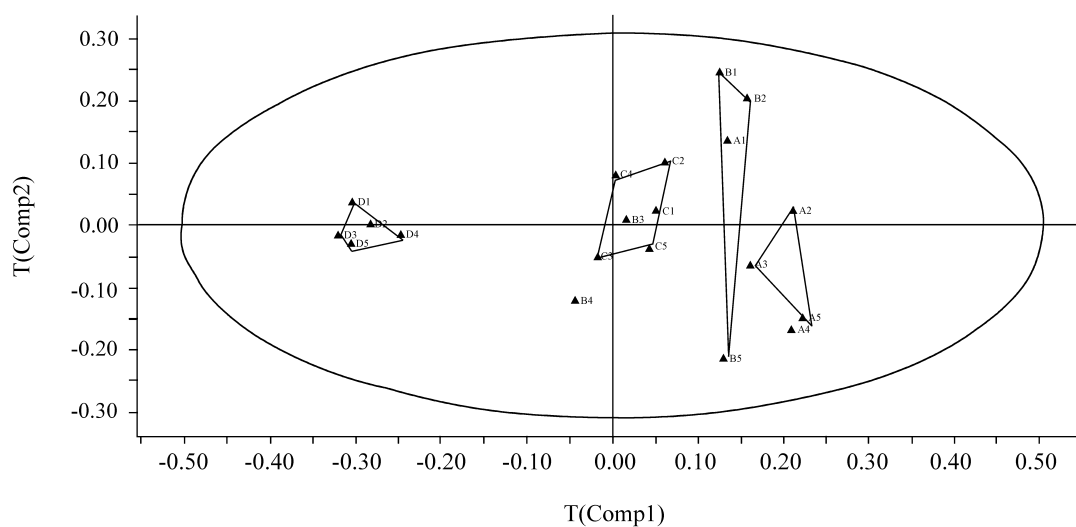
实验结果表明以常规的血浆生化指标改变和肝脏组织病理学异常为判断标准, Z24 对大鼠具有明显的肝毒性。肝毒性的主要表现为肝脏局部弥散性坏死和炎症, 并呈一定的剂量依赖性。动物尿液  $^1\text{H}$  NMR 谱 PCA 表明各剂量组与对照组在分值散点图中呈聚类型分布, 各组间未见重叠, 且各组的相对位置与 Z24 的剂量呈相对应关系, 说明尿液代谢组学分析能够较好地反映 Z24 的肝脏毒性特征, 并提示毒性发生的机制<sup>[7]</sup>。在中、高剂量组大鼠尿液的  $^1\text{H}$  NMR 谱中可以发现乳酸、柠檬酸、甲基胍、琥珀酸、苹果酸、己二酸和顺乌头酸的峰形改变最为明显, 分析这些内源性代谢产物的形成、转移机制和过程可提示 Z24 肝脏毒性发生的潜在原因。乳酸、柠檬酸、苹果酸、顺乌头酸均与三羧酸循环能量代谢及糖酵解途径密切相关, 上述内源性代谢物的改变提示, Z24 处理组动物肝脏能量代谢功能异常。从研究结果中还发现, 己二酸和顺乌头酸含量的改变最为明显, 对照组尿液中己二酸的谱峰相对积分面



**Fig 1. Effect of Z24 on hepatic histopathology ( $\times 360$ ).** A, B, C: livers from rats treated with Z24 200, 130 and  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  for 5 d, respectively. D: normal hepatic morphology. Arrows indicate the necrosis focus.



**Fig 2.** 600-MHz  $[^1\text{H}]$  nuclear magnetic resonance(NMR) urine spectra for Z24-dosed groups. A, B, C: 200, 130 and 60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  group; D: control.



**Fig 3.** Score scattering plot ( $T[\text{Comp1}]$  vs  $T[\text{Comp2}]$ ) for Z24-dosed and control urine samples spectra following principal components analysis. A, B, C: 200, 130 and 60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; D: control.

积在检测灵敏度之下,Z24 对大鼠染毒后,己二酸的谱峰相对积分面积急剧上升,而高剂量组中,大鼠尿液中顺乌头酸的谱峰相对积分面积却降到 NMR 检测的灵敏度之下,顺乌头酸、己二酸、乳酸等发生改变的代谢产物可以作为 Z24 肝脏毒性的生物标志物

做进一步的研究证实。Holmes 等<sup>[8]</sup>利用代谢组学研究肾小管 S3 段损伤性化合物  $\text{HgCl}_2$  和六氯对二甲苯(HCBD),结果随肾小管 S3 段损伤的加剧尿中葡萄糖、乳酸、羟丁酸盐、马尿酸盐、Cr 和酮戊二酸显著升高,表明尿中葡萄糖、乳酸、羟丁酸盐、马尿酸

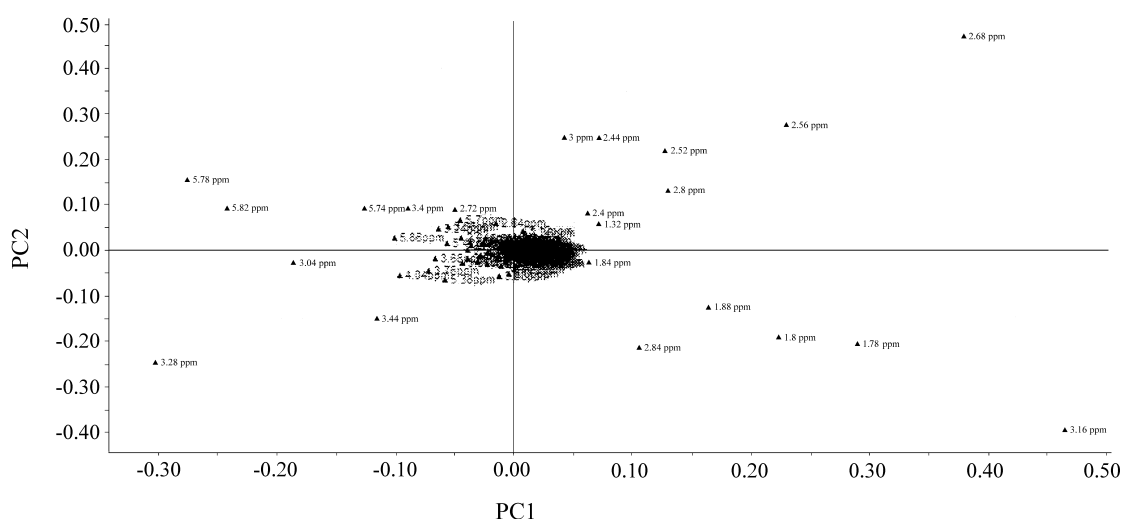


Fig 4. Loading plot of principal components analysis(PC1 vs PC2) for metabolites.

Tab 2. Effect of Z24 on the  $[^1\text{H}]$  NMR spectra relative integral area of metabolites

Z24/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Aconitic acid	Methyl guanidine	Citric acid	Succinic acid	Malate	Hexanedioic acid	Lactate
Control	$70 \pm 25$	$32 \pm 36$	$209 \pm 50$	$118 \pm 24$	$46 \pm 14$	0	$53 \pm 12$
60	$298 \pm 226$	$49 \pm 33$	$356 \pm 252$	$213 \pm 117$	$98 \pm 62$	$482 \pm 127^*$	$98 \pm 53$
130	$317 \pm 172$	$990 \pm 218^*$	$718 \pm 156^*$	$401 \pm 156^*$	$344 \pm 146^*$	$1162 \pm 690^*$	$238 \pm 91^*$
200	$0^*$	$2273 \pm 748^*$	$1590 \pm 665^*$	$919 \pm 386^*$	$692 \pm 258^*$	$1748 \pm 507^*$	$765 \pm 162^*$

$\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control.

盐、Cr 和酮戊二酸可以作为肾小管 S3 段损伤性药物的生物标志物。肾毒性药物 *p*-氨基酚将使尿中的 Cr、乙酸升高,因此 Cr 和乙酸可以作为 *p*-氨基酚肾毒性的标志物<sup>[9]</sup>。与常规的临床生化检测及组织病理学检查相比,代谢组学分析具有许多优势。其一,代谢组学分析的灵敏性高于其常规检验方法,如本研究中低剂量组动物尿液的  $[^1\text{H}]$ NMR 谱能与对照组动物完全区分开来,也与中、高剂量组有较大的差异,从而可推测该组动物的代谢表型可能与动物对 Z24 的应激反应有关,而中、高剂量组动物的代谢表型则可能是 Z24 肝脏毒性的典型表现,这种灵敏性已经在很多研究中获得了证实<sup>[10]</sup>。其二,代谢组学分析具有简单、快速、无创伤等特点。尿液  $[^1\text{H}]$ NMR 分析 1 个工作日可完成约 150 个样品的处理和测定,能满足药物早期毒性筛选的要求;尿液分析不仅对动物无创伤性,且不受采样时间和频率的限制,可进行动态的分析和检测,因而越来越广泛地应用于药物筛选和疾病诊断<sup>[11~13]</sup>。

致谢: 本课题在研究过程中得到盛和章、李玉凤、沈伽弟等

大力协助,在此一并致谢。

#### 4 参考文献:

- [1] Nicholson JK, 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, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids [J]. *Concepts Magn Reson*, 2000, **12**(5): 289–320.
- [3] Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(5):793–811.
- [4] el-Deredy W. Pattern recognition approaches in biomedical and clinical magnetic resonance spectroscopy: a review[J]. *NMR Biomed*, 1997, **10**(3):99–124.
- [5] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1**(2):153–161.

- [6] Wold S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models [J]. *Pattern Recognition*, 1976, **8**: 127 – 139.
- [7] Beckwith-Hall BM, Nicholson JK, Nicholls AW, Foxall PJ, Lindon JC, Connor SC, *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins [J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, **11**(4):260 – 272.
- [8] Holmes E, Connor SC, Nicholls AW, Polley S, Nicholson JK, Lindon JC, *et al.* The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine [J]. *Chemometri Intell Lab Sys*, 1998b, **44**:245 – 255.
- [9] Gartland KP, Bonner FW, Timbrell JA, Nicholson JK. Biochemical characterisation of para-aminophenol-induced nephrotoxic lesions in the F344 rat [J]. *Arch Toxicol*, 1989, **63**(2):97 – 106.
- [10] Robosky LC, Robertson DG, Baker DJ, Rane S, Reily MD. *In vivo* toxicity screening programs using metabolomics[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, **5**(8):651 – 662.
- [11] Holmes E, Nicholson JK, Tranter G. Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks[J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, **14**(2):182 – 191.
- [12] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Connelly JC, Haselden JN, *et al.* Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, **13**(6):471 – 478.
- [13] Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, Wilson ID, Nicholson JK. 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.

## A nuclear magnetic resonance spectroscopic metabonomics analysis for urine from rats administrated Z24 orally

WANG Quan-Jun<sup>1</sup>, YAN Xian-Zhong<sup>2</sup>, WU Chun-Qi<sup>1</sup>, ZHAO Jian-Yu<sup>2</sup>,  
YU Shou-Zhong<sup>1</sup>, YUAN Ben-Li<sup>1</sup>, LIAO Ming-Yang<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*;  
2. *National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China*)

**Abstract:** **AIM** To study effects of Z24 on the metabonomics profile of rat urine and its relationship with blood biochemical indices and histopathology, explore the easibility of metabonomics in the application of early toxicity screening of drug candidate. **METHODS** Twenty female Wistar rats were administrated orally with 60, 130 and 200 mg·kg<sup>-1</sup> Z24 for 5 d, respectively. After dosing, 24 h urine was collected and its [<sup>1</sup>H]NMR spectra were acquired, and subjected to data process and principal components analyses (PCA). On d 7, all animals were taken blood for biochemical analysis and liver histopathology examination. **RESULTS** The plasma GPT, GOT, total bilirubin(TBIL) level of 200 mg·kg<sup>-1</sup> group rats were increased by 148%, 140% and 110% as compared to controls, respectively. There were clear necrosis foci in liver histopathology of 200 and 130 mg·kg<sup>-1</sup> groups. And the

urine metabonomics approach could readily distinguish the Z24 toxicity, with a good agreement between clinical chemistry, microscopical examination and PCA data. And PCA analysis suggested effects at low doses, which were not as evident by clinical chemistry or microscopic analysis. **CONCLUSION** The effect of Z24 on the rat urine metabonomics profile is related to Z24 toxicology which supports the contention that the metabonomics approach represents a promising new technology for the development of a rapid throughout *in vivo* toxicity screening tool.

**Key words:** metabonomics; nuclear magnetic resonance; pattern recognition; toxicity; Z24

**Foundation item:** The project supported by National Plan of High-Tech Research and Development(863)(2002AA2Z342D)

\* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)