

· 论著 ·

左卡尼汀缓解顺铂造成急性肾损伤的血清代谢组学研究

纪松岗¹, 吴琼², 朱臻宇², 董昕², 洪战英², 柴逸峰² (1. 解放军401医院药剂科, 山东青岛266071; 2. 第二军医大学药学院, 上海200433)

[摘要] 目的 利用血清代谢组学探究顺铂诱导小鼠急性肾损伤的特异性变量, 同时评价左卡尼汀的干预作用。方法 将19只小鼠分为正常对照组、模型组和干预组, 适应3 d后, 对干预组给予左卡尼汀(400 mg/kg, ip)干预, 2 d后给予模型组和干预组顺铂(20 mg/kg, ip)造模, 每天称量各组小鼠的体质量, 2 d后取小鼠血清进行LC-MS分析, 结合模式识别分析各组间代谢组差异, 并评价左卡尼汀的干预作用。结果 代谢组学分析共鉴别28个差异代谢物, 顺铂诱导的急性肾损伤主要涉及磷脂类、氨基酸类和脂肪酸类代谢途径的改变, 而左卡尼汀有改善作用。结论 左卡尼汀可改善顺铂诱导的急性肾损伤, 其机制可能是通过调控色氨酸代谢、谷氨酸代谢和能量代谢, 从而减缓急性肾损伤的疾病进程。

[关键词] 左卡尼汀; 顺铂; 急性肾损伤; 代谢组学

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)05-0429-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.012

L-carnitine alleviating cisplatin induced acute kidney injury through serum metabolomics analysis

Ji Songgang¹, Wu Qiong², Zhu Zhenyu², Dong Xin², Hong Zhanying², Chai Yifeng² (1. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore specific variables related to cisplatin induced acute kidney injury, serum metabolomics techniques were applied and simultaneously the value of intervention effects of *L*-carnitine were appraised. **Methods** 19 mice were divided into the normal control group, model group, and intervention group. After a three day accommodation period, the intervention group was given *L*-carnitine (400 mg/kg, ip). Two days later, cisplatin (20 mg/kg, ip) was given to the model and intervention groups. The body weight of every mouse in each group was measured daily. Two days after the serum sample of each mice was collected and analyzed by LC-MS, pattern recognition analysis of metabolomics differences among the groups, and the effectiveness of *L*-carnitine intervention were evaluated. **Results** A total of 28 metabolites were identified through serum metabolomics analysis. Our data shows that there is a possible mechanism that cisplatin induced AKI was mainly involved in changing phospholipids, amino acid and fatty acid metabolic pathways and *L*-carnitine mitigates the damage of acute kidney injury induced by cisplatin. **Conclusion** *L*-carnitine can alleviate cisplatin induced acute kidney injury by regulating tryptophan metabolism, glutamate metabolism, and energy metabolism.

[Key words] *L*-carnitine; cisplatin; acute kidney injury; metabolomics

顺铂(cisplatin)为第二代抗癌金属铂药物, 是二氯化铂的顺式体。虽然顺铂抗肿瘤广谱高效, 但因其细胞毒性大、对癌细胞选择性低等缺陷, 导致药物不良反应发生率高, 从而限制了其临床应用^[1]。肾毒性是顺铂最严重的一种不良反应, 其中

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)较为常见, 急性肾损伤是指小于等于3个月的肾脏功能或结构方面的异常, 包括血、尿、组织检查或影像学方面的肾损伤标志的异常, 临床具有起病急、早期诊断困难、病情进展快、病死率高等特点^[2]。顺铂导致AKI的具体机制尚不明确, 目前研究认为主要与氧化应激、脂质过氧化、细胞内钙稳态失调等有关^[3]。

左卡尼汀具有降血压、抗氧化及抗炎作用^[4], 一般用于治疗急性心肌梗死、充血性心力衰竭等患有心脏病的长期透析患者及低血压患者等。左卡尼汀在脂类代谢中发挥重要的作用, 通过催化长链脂肪

[基金项目] 自然科学基金面上项目(81273472); 上海市中药现代化基金重点基金(12401900802)

[作者简介] 纪松岗, 博士, 主任药师。研究方向: 中药复杂体系的分离分析。E-mail: jjsonggang@126.com

[通讯作者] 柴逸峰, 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 中药复杂体系的分离分析。E-mail: yfchai2003@163.com

酸的 β 氧化生成ATP供能,而AKI与能量代谢密切相关,所以有研究者猜测左卡尼汀在一定程度上可以用于AKI的预防和临床治疗^[5],但左卡尼汀的效应机制并不清楚。

代谢组学作为系统生物学的分支,研究对象为生物体内低相对分子质量的代谢小分子,以一个或多个特定代谢物的动态规律变化来表征生物体的生理病理变化趋势,最终通过还原相关联生物事件提示生物体的病理生理变化实质和机制所在。鉴于此,笔者开展了顺铂诱导小鼠急性肾损伤的血清代谢组学研究,并通过比较左卡尼汀干预下代谢物的变化情况,探讨左卡尼汀对顺铂诱导小鼠急性肾损伤的保护作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 试剂 HPLC级甲醇和乙腈购自Merk公司(Darmstadt, Germany); HPLC级甲酸购自Fluka公司(Buchs, Switzerland);花生四烯酸、18-羟基花生四烯酸、十八碳四烯酸、亚油酸和2-羟基亚麻酸均购自Sigma-Aldrich公司;溶血磷脂酰胆碱类购自Larodan AB公司;色氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸和亮氨酸购自上海纯晶试剂有限公司;超纯水由本实验室Milio-Q超纯水系统制得。左旋肉碱和顺铂均购自第二军医大学长海医院药剂科。

1.2 实验动物 洁净级SD小鼠19只,体质量为 25 ± 5 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠饲养于保持12 h/12 h昼夜的房间中并给予标准饲料,控制室内温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度为40%左右。实验前适应饲养3 d。

1.3 仪器 Agilent 1290 Infinity液相色谱仪(Agilent 有限科技公司);6530 Accurate-Mass串联四级杆-飞行时间质谱仪(Agilent 有限科技公司);Milli-Q超纯水系统(Millipore 中国有限公司);微型涡旋混合仪(Thermo公司)。

2 方法

2.1 急性肾损伤模型的建立及左卡尼汀干预 将19只小鼠分为3组,其中造模组和干预组各6只,对照组7只。干预组第3天腹腔注射给予左卡尼汀(400 mg/kg),对照组和造模组给予相应剂量的生理盐水。干预48 h后,干预组和造模组均腹腔注射给予顺铂(20 mg/kg)以形成急性肾损伤模型,对照组给予相应剂量生理盐水。所有小鼠每天称其体质量以监测左卡尼汀干预和顺铂造成急性肾损伤病理过程对小鼠体质量的影响。

2.2 样品收集与制备 顺铂造模48 h后,小鼠眼眶取血,在室内静置1 h。血样在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $3\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min,分离得上层血清,分成两部分,一份用于生化指标检测,另一份用于代谢组学分析。

2.2.1 生化指标分析样品制备 取 $100\ \mu\text{l}$ 血清, $3\ 500\text{ r/min}$ 离心10 min后收集上清液,用Beckman自动生化仪测定血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)。

2.2.2 代谢组学分析样品制备 取 $100\ \mu\text{l}$ 血清,加入 $400\ \mu\text{l}$ 甲醇,涡旋1 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $13\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min除蛋白。上清液转移至进样小瓶中,放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中等待进样。为了考察系统的稳定性和样品对系统的适应性,质量控制(QC)样品通过合并等量来自不同血清样品制备得到。

2.3 血清代谢组学分析

2.3.1 色谱条件 色谱分离采用ACQUITY UH-PLCTM BEH C_{18} 柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.7\ \mu\text{m}$, Waters, Milford, MA)色谱柱,柱温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。流动相A为0.1%的甲酸水溶液,流动相B为0.1%的甲酸-乙腈,采用梯度洗脱,梯度设置如下:0~2 min, 0%~15% B; 2~10 min, 15%~30% B; 10~14 min, 30%~95% B; 14~17 min, 95% B; 17~19 min, 95%~0% B。平衡色谱柱5 min,流速为 $400\ \mu\text{l/min}$,进样量为 $4\ \mu\text{l}$ 。

2.3.2 质谱条件 离子源为ESI,质谱采用正负离子进行检测。检测参数:毛细管电压为 $3\ 500\text{ V}$,干燥气流速 11 L/min ,干燥气温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$,喷雾气压 45 psi ,碎裂电压 120 V ,Skimmer电压 60 V ,数据采集范围 $m/z\ 50\sim 1\ 000$,选取 $m/z\ 121.0509$ 和 $m/z\ 922.0098$ 的内标离子进行实时质量数校正。潜在生物标志物离子进一步进行MS/MS分析,根据离子情况在 $10\sim 30\text{ V}$ 之间调整碰撞电压。

2.4 数据处理与模式识别 在进行模式识别前,将原始数据(.d)经Agilent MassHunter Qualitative software软件转换为通用格式(.mzData),并进行去同位素峰处理。转换后的数据进一步通过XCMS(<http://mmetlin.scripps.edu/download/>)进行峰校正和峰积分,最终得到一个保留时间、质核比和峰强度的三维矩阵。XCMS参数除设定 $\text{fwhm}=10$, $\text{bw}=10$ 和 $\text{snthresh}=5$ 以外,其他参数均采用默认值。采用修正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。将数据进行归一化和中心化。将标准后的数据矩阵导入SIMCA-P(Umetrics, Sweden)进行偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。通过交叉验证参数

$Q^2 Y$ 和 $R^2 Y$ 对所构建的模型质量进行评判。应用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对有显著性差异的变量在对照组、干预组和造模组中的含量进行分析, 并进行多组间的两两比较。当变量满足 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$, 认为其为潜在的生物标志物。

3 结果与讨论

3.1 左卡尼汀干预和顺铂造模期间对小鼠体质量及生化指标的影响 如图 1 所示, 造模前, 3 组小鼠体质量变化不显著, 且趋势一致; 顺铂造模后, 干预

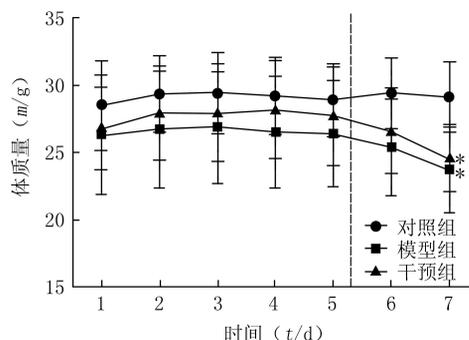


图 1 小鼠干预和造模期间体质量随时间变化曲线

* $P < 0.05$, 与同天正常组小鼠体质量相比

组和造模组的体质量呈现明显的下降趋势, 造模第 2 天最为明显 ($P < 0.05$)。左卡干预组对体质量下降有一定的抑制作用, 但与模型组相比, 差异不明显 ($P > 0.05$)。另外, 由表 1 所示, 顺铂诱导模型组的 BUN、SCr 均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而左卡尼汀干预后 BUN、SCr 的水平有所下降, 但是与模型组相比没有显著差异 ($P > 0.05$), 可能与实验时间较短有关。

表 1 3 组小鼠肾功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BUN ($\text{CB}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Scr ($\text{CB}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	11.28 ± 2.01	15.24 ± 1.16
模型组	$36.95 \pm 6.11^*$	$72.87 \pm 8.37^*$
干预组	$32.49 \pm 3.45^*$	$68.02 \pm 6.32^*$

* $P < 0.05$, 与对照组同时间比较

3.2 多元统计分析 为了研究左卡尼汀对顺铂诱导的小鼠急性肾损伤的干预作用, 笔者采用多元统计分析对正负离子模式下的 3 组小鼠的血清代谢谱进行分析。如图 2 所示, 在 PLS-DA 的三维得分图中可以看到, 模型组偏离正常对照组的趋势最大, 左

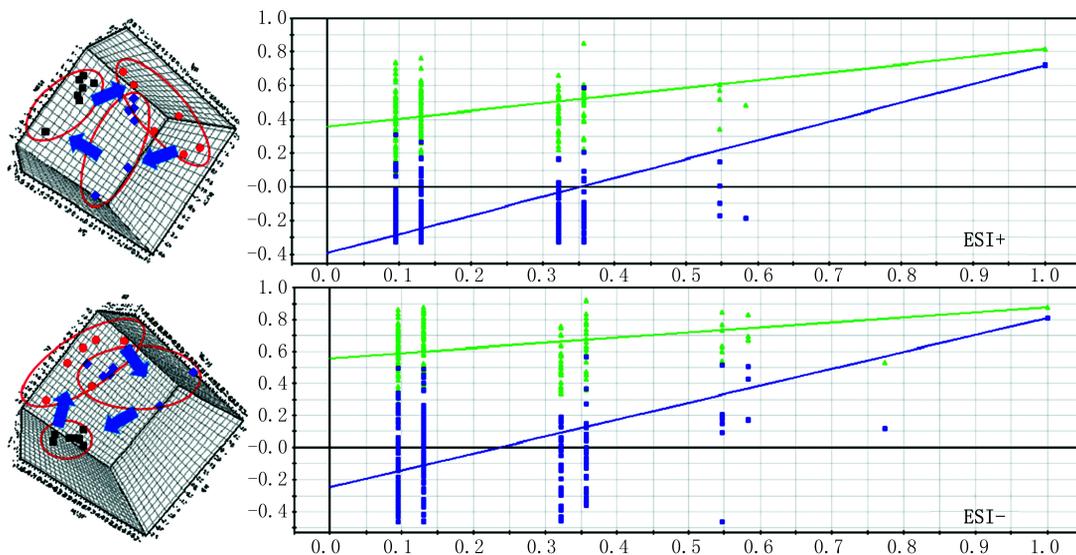


图 2 基于 UHPLC/TOF-MS 的 PLS-DA 得分图及相应的交叉验证图

■. 正常对照组; ●. 模型组; ◆. 干预组

卡尼汀干预组位于正常组和模型组之间。从 3 组之间的距离并结合各组体质量的变化, 左卡干预组与模型组相比有明显的改善。

另外, 从正负离子模式的 200 次交叉验证图可以看出, 3 组构建的 PLS-DA 分类模型稳定性好, 没有出现拟合现象。

3.3 代谢物鉴别与生物学意义解释 结合多元统

计分析及单元统计分析, 满足 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 的差异变量共 28 个。之后笔者将这些有意义的变量和网络数据库 (metlin, HMDB) 进行比对并用标准品进行验证, 发现这 28 个差异代谢物主要可归为 3 类: 磷脂代谢物、氨基酸代谢物及脂肪酸代谢物, 具体如表 2 所示, 而差异代谢物在 3 组之间的相对强度见图 3。

表2 左卡尼汀缓解顺铂造成急性肾损伤相关潜在生物标志物

标号	离子(质核比)	保留时间(<i>t</i> /min)	分子式	加和物	化合物	VIP	<i>P</i> 值
1	512.3	9.68	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(14:0)	1.05	<0.001
2	494.326	10.04	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	M+H	LysoPC(16:1(9Z))	1.85	<0.001
3	552.331	10.58	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	M+FA-H	LysoPC(P-18:0)	1.03	<0.001
3	508.341	10.59	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	M+H	LysoPC(P-18:0)	1.05	<0.001
4	546.358	10.87	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	M+Na	LysoPC(0:0/18:0)	2.15	<0.001
5	522.348	10.42	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	M+H	LysoPC(18:1(9Z))	1.59	<0.001
5	566.35	10.95	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(18:1(9Z))	2.88	0.001
6	542.323	10.42	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	M+Na	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	1.20	<0.001
6	520.345	10.42	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	M+H	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	3.40	<0.001
6	564.334	10.21	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	2.77	<0.001
7	562.316	9.93	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(18:3(9Z,12Z,15Z))	1.37	<0.001
8	550.389	12.45	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	M+H	LysoPC(20:1(11Z))	1.29	0.002
9	548.373	11.52	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	M+H	LysoPC(20:2(11Z,14Z))	1.53	<0.001
9	592.363	11.51	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(20:2(11Z,14Z))	1.43	<0.001
10	590.347	10.68	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))	1.86	<0.001
11	586.316	9.90	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.31	0.003
12	614.347	10.43	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	M+FA-H	LysoPC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	1.13	0.001
12	570.357	10.71	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	M+H	LysoPC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	1.29	<0.001
13	126.056	0.73	C ₂ H ₇ NO ₃ S	M+H	牛磺酸	1.09	<0.001
14	319.23	11.69	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	M-H	18-羟基花生四烯酸	3.07	<0.001
15	293.177	9.29	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	M-H	2-羟基亚麻酸	1.32	0.002
16	321.243	11.69	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	M+FA-H	十八碳四烯酸	1.16	0.011
17	303.233	11.69	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	M+Na	亚油酸	2.07	<0.001
18	327.233	11.57	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	M+Na	花生四烯酸	1.38	<0.001
19	204.067	6.05	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	M-H	吡啶乳酸	2.08	0.002
20	117.019	1.30	C ₄ H ₆ O ₄	M-H	琥珀酸	1.62	<0.001
21	162.113	0.71	C ₇ H ₁₅ NO ₃	M+H	左旋肉碱	1.89	<0.001
22	400.344	11.34	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	M+H	棕榈酰肉碱	1.26	0.004
23	132.077	0.73	C ₆ H ₁₃ NO ₂	M+H	亮氨酸	1.55	0.01
24	203.083	4.25	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	M-H	色氨酸	1.85	<0.001
24	205.098	4.25	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	M+H	色氨酸	1.81	0.007
25	227.99	7.23	C ₄ H ₉ NO ₃ S	M+FA-H	同型半胱氨酸	1.63	<0.001
26	131.071	4.42	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	M-H	鸟氨酸	1.43	<0.001
27	166.087	2.38	C ₉ H ₁₁ NO ₂	M+H	苯丙氨酸	1.80	0.013
28	188.071	4.25	C ₁₁ H ₉ NO ₂	M+H	吡啶丙烯酸	1.63	0.004

如图3所示,模型组与正常组相比,氨基酸代谢物和脂肪酸代谢物上调,而磷脂代谢物却呈现下调趋势。干预组和模型组大致上有相同的变化趋势,而琥珀酸、鸟氨酸、吡啶乳酸、吡啶丙烯酸、色氨酸和左旋肉碱却出现明显的回调趋势。左旋肉碱含量增加可能与给予干预组左旋肉碱有关,而色氨酸、吡啶丙烯酸与吡啶乳酸参与色氨酸代谢,吡啶类是色氨酸的代谢产物,研究表明吡啶类是肾类疾病的特征性标志物^[6],左卡尼汀干预后,下调的吡啶类代谢物及上调的色氨酸表明左卡尼汀通过抑制色氨酸-吡啶类物质这一代谢途径继而改善顺铂诱导的急性肾损伤。琥珀酸是三羧酸循环的中间产物,模型组较正常组水平上调表明模型组能量代谢发生异常,这

一发现与之前的报道一致^[7]。而左卡尼汀干预后出现回调趋势则表明左卡尼汀可能参与了能量代谢继而发挥干预作用。鸟氨酸是尿素循环的中间产物,其底物为精氨酸,左卡尼汀干预后,干预组较模型组鸟氨酸水平下调间接表明精氨酸水平下调,而精氨酸水平和谷氨酸水平相关,谷氨酸具有抗氧化作用^[8],基于此,笔者猜测左卡尼汀通过调控谷氨酸代谢减少氧化应激,继而改善顺铂诱导的急性肾损伤。

溶血磷脂酰胆碱类(LysoPCs)和游离脂肪酸类(花生四烯酸、亚油酸及十八碳四烯酸等)是AKI相关的重要的代谢产物,而这两类物质都是磷脂酰胆碱(PCs)经磷脂酶A2(PLA2)催化的水解产物^[9]。而磷脂是细胞膜的重要成分,其产物LysoPCs是细

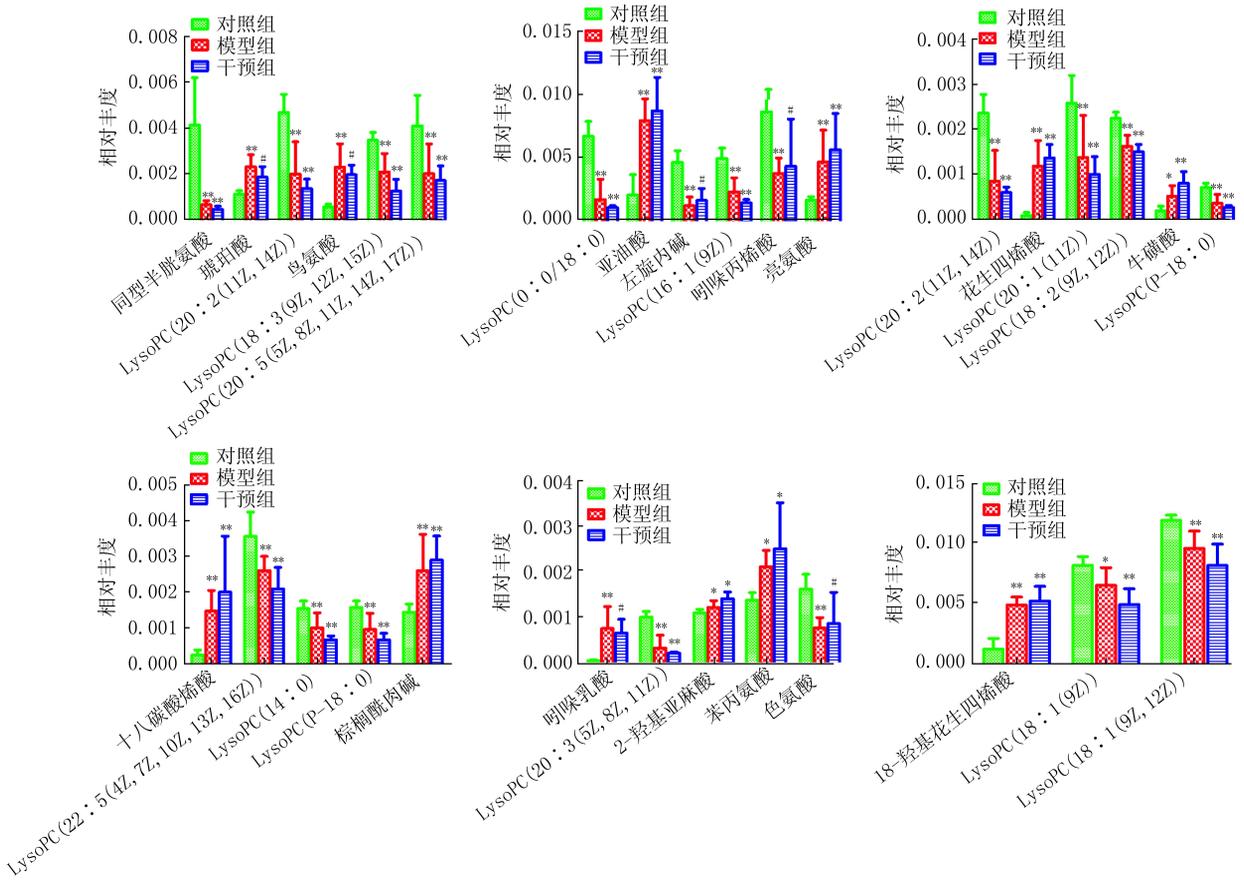


图3 不同离子在对照组、模型组和干预组中相对强度比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与对照组比较; # $P < 0.05$,与模型组比较

胞内信使,具有促炎、诱导细胞凋亡的作用^[9]。因此该过程使细胞毒性增强,而这可能是急性肾损伤的诱因。左卡尼汀干预后,两类物质并没有出现回调趋势,这一现象表明左卡尼汀干预机制可能并不涉及这两条代谢通路。

4 结论

综上所述,左卡尼汀可以减缓顺铂诱导的小鼠急性肾损伤病理进程,其机制可能主要是通过调节色氨酸代谢、谷氨酸代谢及能量代谢相关通路,继而减少尿毒症毒素的积聚,减少氧化应激,保护线粒体功能,从而减缓急性肾损伤病理进程。

【参考文献】

[1] 朱晓红. 顺铂的不良反应及防护[J]. 药物与临床, 2001, 16(2): 35-37.
 [2] 张立元, 朱振红, 王敏, 等. NGAL 预测和早期诊断顺铂所致急性肾损伤的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(14): 1113-1116.
 [3] 潘晶晶, 宣小燕, 张爱华, 等. 线粒体功能障碍参与顺铂诱导的小鼠急性肾损伤[J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 29(12): 914-919.

[4] Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, et al. L-carnitine attenuates the development of kidney fibrosis in hypertensive rats by upregulating PPAR- γ [J]. Am J Hypert, 2014, 27(3): 460-470.
 [5] Liu Y, Yan S, Ji C, et al. Metabolomic changes and protective effect of L-carnitine in rat kidney ischemia/reperfusion injury[J]. Kidney Blood Press Res, 2012, 35(5): 373-381.
 [6] Zgoda-Pols JR, Chowdhury S, Wirth M, et al. Metabolomics analysis reveals elevation of 3-indoxyl sulfate in plasma and brain during chemically-induced acute kidney injury in mice: investigation of nicotinic acid receptor agonists [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 255(1): 48-56.
 [7] Portilla D, Schnackenberg L, Beger RD. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury [J]. Semin Nephrol, 2007, 27(6): 609-620.
 [8] Song X, Wang J, Wang P, et al. ¹H NMR-based metabolomics approach to evaluate the effect of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction on hyperlipidemia rats induced by high-fat diet [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 78-79: 202-210.
 [9] Wong M, Lodge JK. A metabolomic investigation of the effects of vitamin E supplementation in humans [J]. Nutr Metab (Lond), 2012, 9(1): 110.

[收稿日期] 2014-11-27 [修回日期] 2015-05-11

[本文编辑] 陈静