

· 论著 ·

基于 UPLC-Q-TOF/MS 平台的结晶肾损伤小鼠的尿液代谢组学研究

王学雷¹, 晁玉凡², 高松燕², 董昕², 温晓飞¹ (1. 上海东方医院泌尿外科, 上海 200120; 2. 海军军医大学药学院测试中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 通过研究草酸钙结石小鼠尿液中代谢物的变化, 探究草酸钙结晶导致肾损伤的内在机制。方法 以乙醛酸盐诱导的小鼠草酸钙结晶模型为对象, 采用基于超高效液相-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)的代谢组学方法测定尿液中内源性代谢物的变化, 并采用 SIMCA-P 进行多元统计分析, Metabo Analyst 软件进行代谢物通路分析。结果 与正常组相比, 模型组小鼠的肾组织出现明显的钙盐沉积且血清中的肌酐和尿素氮含量异常升高, 肾脏出现损伤; 从尿液中筛选出尿酸、牛磺酸、苯丙氨酸等 21 个差异代谢物。结论 通过代谢物通路分析, 差异代谢物主要涉及氨基酸代谢、能量代谢、牛磺酸代谢、嘌呤代谢和 VB₆ 代谢, 为进行结石疾病机制研究以及早期标志物的筛选提供了重要参考。

[关键词] 代谢组学; 草酸钙结晶; 超高效液相-串联质谱; 乙醛酸盐; 差异代谢物

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0126-09

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.006

Urinary metabolomics study on mice renal injury caused by calcium oxalate crystal based on UPLC-Q-TOF/MS platform

WANG Xuelei¹, CHAO Yufan², GAO Songyan², DONG Xin², WEN Xiaofei¹ (1. Department of Urology, Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore the intrinsic mechanism of kidney injury due to calcium oxalate crystal by the study on the changes of metabolites in the urine of mice. **Method** UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics method was used to determine the changes of endogenous metabolites in mice urine with glyoxylate-induced mouse calcium oxalate crystal model. The multivariate statistics analysis and metabolite pathway analysis were performed by SIMCA-P and Metabo Analyst software respectively. **Result** Compared with the control group, the kidney tissue of the model group showed obvious calcium salt deposition and the serum creatinine and urea nitrogen levels increased abnormally. 21 differential metabolites, such as uric acid, taurine and phenylalanine, were detected from the urine. **Conclusion** The differential metabolites mainly involve amino acid metabolism, energy metabolism, taurine metabolism, purine metabolism and VB₆ metabolism, which is of great importance to the mechanism study and the biomarker screening for the early stage stone disease.

[Key words] metabolomics; calcium oxalate crystal; UPLC-Q-TOF/MS; glyoxylate; differential metabolites

进入 21 世纪以来, 泌尿系结石的患病率在全球范围内呈现高发态势, 并且伴随全球气候变暖、人们生活习惯和饮食的变化等, 发病率在继续上升^[1-2]。最新研究显示, 中国的男性肾结石患病率为 6.5%, 女性为 5.1%^[3]。肾结石病程较长且病程反复, 在首次发病后, 有 50% 的患者可能会在 7 年内再次发病^[4]。并且肾结石可增加发生慢性肾病以及终末期

肾病的概率^[5-6]。

草酸钙结石约占肾结石的 80%^[7], 目前对草酸钙结石的研究认为肾小管上皮细胞的损伤对草酸钙结石的形成至关重要^[8], 而细胞内的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 直接参与损伤的过程^[9-10]。由于缺乏对疾病整体动态的认识, 草酸钙结晶导致肾损伤的机制仍未明确。流行病学研究表明, 代谢综合征患者有较高的结石患病率^[11], 且机体代谢紊乱在结石的形成过程中发挥重要作用^[12], 因此对草酸钙结石进行系统性的代谢评价有利于疾病的发病机制研究以及早期诊断和个性化防治^[1]。代谢组学是继基因组学、蛋白组学之后系统生物学的重要分支, 旨在对反映生物体状态变化的内源性

[基金项目] 上海市浦东新区科技发展基金(PKJ2013-Y21); 上海市科学技术委员会科研计划项目(15401900800)

[作者简介] 王学雷, 主治医师, 研究方向: 泌尿系统结石的微创治疗和基础研究, Tel: 13817031989, Email: wangxueleihome@163.com

[通讯作者] 温晓飞, 副主任医师, 研究方向: 泌尿系统结石的临床和基础研究, Tel: 13386057206, Email: wenziaofei2000@hotmail.com

代谢物群体进行全面的监测和研究^[13-14],可以为草酸钙结石引起的肾损伤的系统性代谢变化研究提供一个有力工具。

尿液中草酸盐含量的升高是草酸钙结石形成的重要因素。目前,乙醛酸盐作为草酸盐的前体被用于诱导草酸钙结石模型^[15]。本研究以 UPLC-Q-TOF/MS 的代谢组学方法为主要研究手段,以常规组织生化分析为辅助,使用乙醛酸盐诱导的小鼠草酸钙结晶模型对草酸钙结晶造成的肾损伤过程中尿液内源性代谢物的变化情况进行系统研究,为疾病的形成机制研究以及早期生物标志物的筛选提供方向。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

色谱级甲醇、乙腈(Merck, Germany)。HPLC 级甲酸(Fluka, Switzerland)。乙醛酸(TCI, Japan),加入 NaOH 调至 pH7.4 配成乙醛酸盐。超纯水由 Milli-Q 水净化系统(Millipore Corp., USA)制备得到。色氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、牛磺酸、尿酸标准品(Sigma-Aldrich, USA)。

1.2 乙醛酸盐诱导的小鼠结晶肾损伤模型的建立^[16]

18 只 7~8 周龄 C57B/L6 雄性小鼠购自上海斯莱克斯实验动物有限公司。经过 1 周的适应性饲养,将小鼠随机分为 3 组,对照组(U0)、模型 1 d 组(U1)和模型 5 d 组(U5),每组 6 只。模型组每天腹腔注射 100 mg/kg 的乙醛酸盐造模,对照组每天腹腔注射等量生理盐水。

1.3 生物样本的采集^[16]

对照组和模型组在最后一次注射后,置于代谢笼中收集 24 h 尿液(正常饮水,禁食),4 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液。眼眶取血,室温静置 1 h 后,3 500 r/min,4℃离心 15 min,取血清。所有离心后尿样和血清于-80℃冻存。行心脏灌流后,采集肾脏,置于 4%多聚甲醛中固定。

1.4 动物模型评价

测定各组血清中肌酐和尿素氮含量。将固定后的肾组织用石蜡包埋,切成 3~4 μm 的薄片,采用冯库萨试剂盒(杰美基因,上海)进行染色。在 400 倍放大倍数下,观察肾组织钙沉积情况。

1.5 样品的制备

将尿液在 4℃解冻后,取 100 μl 尿样,加入 300 μl 甲醇进行蛋白沉淀和代谢物提取。涡旋 5 min,将样品置于 4℃静置 10 min,于 13 000 r/min,4℃离心 10 min。取 150 μl 上清液于进样小瓶中待分析。此外,每个样本各取 50 μl 上清液混合成质控样本

(quality control, QC),用于考察系统的稳定性。

1.6 尿样的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

UPLC-Q-TOF/MS 分析使用安捷伦 1290 Infinity 液相系统和安捷伦 6538 高分辨单四级杆-飞行时间串联质谱联用仪(Agilent, USA)。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T₃ 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm, Waters),柱温 40℃。流动相为 0.1%甲酸(A)-含 0.1%甲酸的乙腈(B)。优化后的梯度条件:0~2 min, 5% B; 2~10 min, 5%~15% B; 10~14 min, 15%~30% B; 14~17 min, 30%~95% B; 17~19 min, 95% B。流速:0.4 ml/min,进样量:3 μl,自动进样器温度:4℃。

质谱使用电喷雾离子源(ESI)采集正、负离子数据。为了监测及考察系统的稳定性,在尿液的正、负离子模式下分别随机插入 6 针 QC。通过无监督的主成分分析(PCA)中 QC 的聚集程度考察系统的稳定性。同时,计算每个离子在 QC 样品中的相对标准偏差(RSD, %),如 RSD 大于 20%认为变异较大,其显著性的差异可能是由于偶然相关造成的^[17]。

1.7 数据处理及统计学分析

使用 R 软件平台,调用 XCMS 程序包,进行峰的识别、校正和积分。将变量根据 80%原则筛选去除噪音信号^[18]和面积归一化后,导入到 SIMCA-P 11.0 (Umetrics, Sweden)进行多元统计分析。采用无监督的 PCA 分析表征样本组间的分离趋势以及观测离群值^[19],用得分图表征结果。采用有监督的偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)进行差异物质的筛选,用得分图和 S-Plot 图表征结果。S-Plot 图中每个点代表一个变量,离原点越远的变量,其可能对组间差异的贡献率越大,则 VIP (variance importance)值就越大^[20]。并根据 R²、Q²值以及排列测试的结果对模型进行验证^[21],R²表示数据模型在某方向上可以解释的变量与总变量的比值,Q²表示模型的预测能力^[22]。将 VIP 值大于 1 的变量作为显著差异物质的候选变量。

采用单因素方差分析对多组间差异进行显著性分析,独立样本 t 检验对两组间差异进行显著性分析。 $P < 0.05$ 认为在统计学上有显著性差异。数据以($\bar{x} \pm s$)的形式表示。

1.8 差异代谢物的鉴别^[23]

首先,利用在线网络数据库如 Metlin (<http://metlin.scripps.edu/>), Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) 进行匹配,以及利用 MassHunter 定性软件对精确 m/z 值进行分子式匹配,对离子进行推断性鉴别;然后,进行 MS/MS 分

析,对采集的 MS/MS 碎片与 Metlin 数据库中的碎片信息进行比对以确定代谢物;对于易得到标准品的代谢物,将其保留时间以及 MS/MS 碎片信息与标准品进行比对,最终确证代谢物。

2 结果与讨论

2.1 肾钙含量测定

冯库萨染色(图 1)显示,对照组的肾脏中未出

现钙沉积,模型组的肾小管腔及间质中均可见大量的黑色钙盐沉积,肾小管腔明显扩大。且 U5 组的钙盐沉积情况比 U1 组更明显。

2.2 血清生化指标分析

如图 2 所示,与 U0 组相比,U5 组中肌酐($P < 0.05$)、尿素氮($P < 0.001$)的含量均显著升高,且 U5 组尿素氮的含量比 U1 组明显上升($P < 0.05$),表明模型组出现了一定的肾损伤。

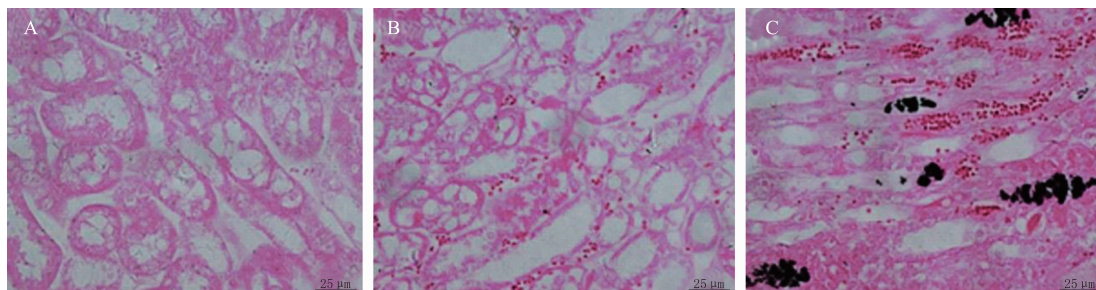


图 1 肾脏组织的冯库萨染色图($\times 400$)

A. U0 组;B. U1 组;C. U5 组

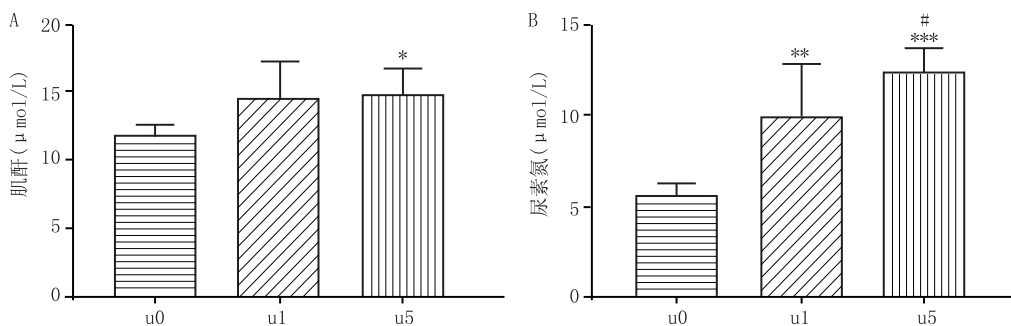


图 2 血清中的肌酐和尿素氮含量

A. 肌酐含量;B. 尿素氮含量

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与 U0 组比较;# $P < 0.05$,与 U1 组比较

2.3 尿液代谢组学轮廓分析与差异代谢物的筛选

UPLC-Q-TOF/MS 采用正、负两种模式对尿液进行数据采集,两种模式下典型的总离子流图(TIC)见图 3,色谱峰分布均匀。如图 4 所示,正、负离子模式下,QC 的聚集状况均良好,表明系统的稳定性良好。U0 组、U1 组和 U5 组的 PCA 得分如图 5 A、5B 所示,U5 与 U0 组分离趋势显著,U1 与 U0 组分离趋势不明显。同时,笔者使用 Metaboanalyst 软件将 3 组数据进行聚类分析,从图 5 C、5D 可以看出,U1 组的个体差异较大,不能与 U0 很好的区分。因此,对 U5 与 U0 组尿液进行有监督的 PLS-DA 分析,筛选乙醛酸盐诱导的结晶肾损伤的差异

代谢物。根据 R^2 、 Q^2 值以及排列测试对 PLS-DA 模型进行验证。PLS-DA 得分和 S-Plot 见图 6 A-D 所示,正、负离子模式下 U0 和 U5 组明显分离。正模式下, $R^2 Y = 0.98$, $Q^2 = 0.708$;负模式下, $R^2 Y = 0.992$, $Q^2 = 0.786$;排列测试图如图 6 E、6F 所示,模型均良好,未出现拟合现象。笔者结合 VIP 值和离子在组间的变化倍数(fold change, FC)筛选差异物质。VIP > 1 且 $|FC| > 1.5$ 的离子认为是 U0 和 U5 组的显著差异离子,同时剔除在 QC 样本中 RSD (%) 值大于 20 的离子。经独立样本 t 检验,认为 $P < 0.05$ 的变量是乙醛酸盐诱导的结晶肾损伤尿液中潜在的生物标志物。

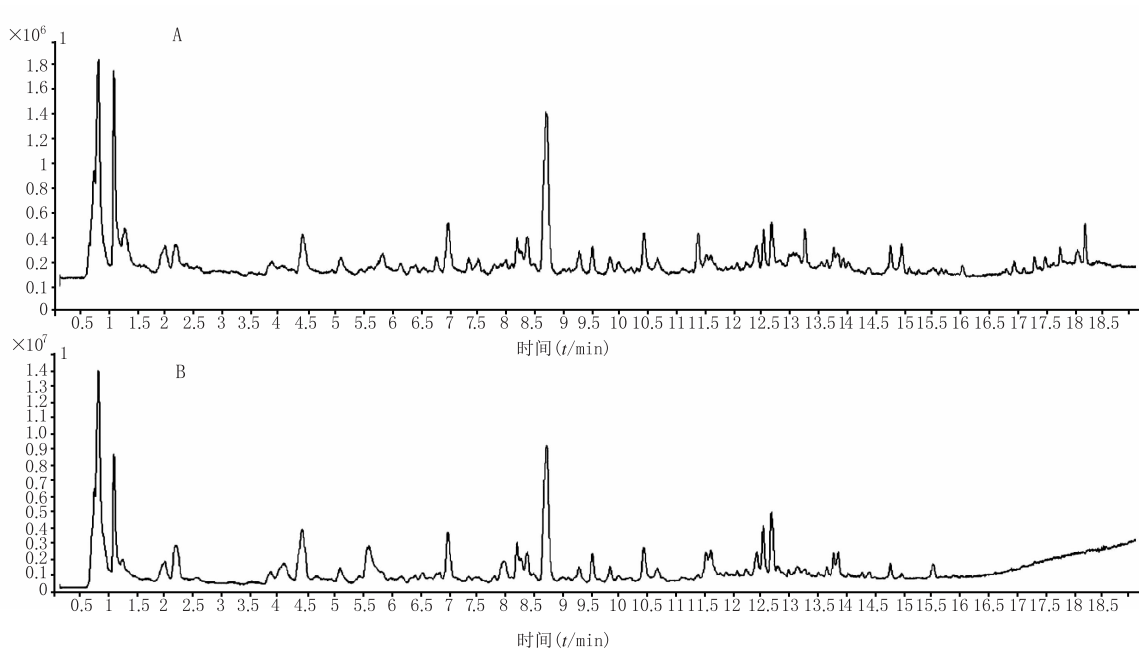


图3 尿液正、负离子模式下典型的总离子流图
A. 正离子模式下; B. 负离子模式下

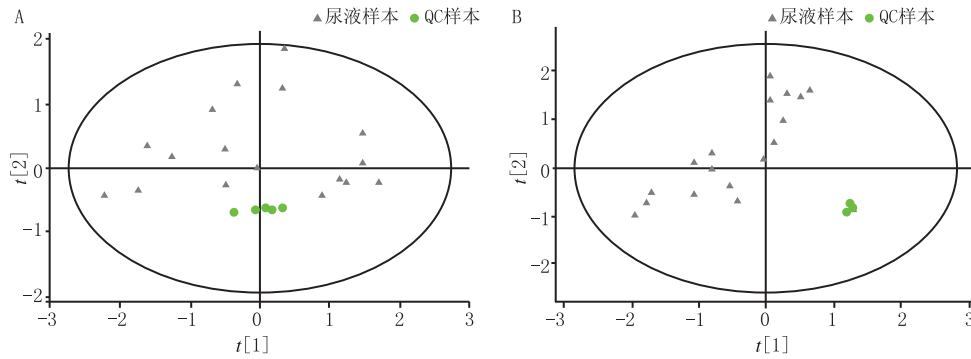


图4 3组尿样及QC样品正、负离子模式下的主成分分析得分图
1. 正离子模式下; B. 负离子模式下

对差异代谢物进行鉴别,最终从尿液中鉴别出21个差异代谢物,见表1。

表1 乙醛酸盐诱导的结晶肾损伤小鼠尿液差异代谢物列表

序号	质荷比 (m/z)	保留时间 (t /min)	加和离子	分子式	代谢物	碎片离子	FC (U5/U0)	P 值	QC (RSD, %)
1	147.113	0.56	$[M+H]^+$	$C_6H_{14}N_2O_2$	赖氨酸	130.0865, 84.0806	2.69	2.45E-04	14.30
2	309.166	0.56	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{24}N_2O_7$	果糖赖氨酸	—	0.26	4.97E-03	5.78
	307.149	0.59	$[M-H]^-$	$C_{12}H_{24}N_2O_7$	果糖赖氨酸	—	0.25	9.75E-03	5.03
3	189.161	0.61	$[M+H]^+$	$C_9H_{20}N_2O_2$	三甲基赖氨酸	171.1485, 130.0860, 117.1022, 100.0756, 84.0809, 72.0810, 60.0808	0.39	9.66E-04	18.62
4	135.030	0.67	$[M-H]^-$	$C_4H_8O_5$	苏氨酸	89.0237, 75.0082, 59.0127, 56.9983	0.47	1.53E-02	5.81
5	124.008	0.68	$[M-H]^-$	$C_2H_7NO_3S$	牛磺酸	79.9573, 94.9802	0.25	2.12E-02	7.66
6	160.132	0.72	$[M+H]^+$	$C_8H_{17}NO_2$	乙酰甲胆碱	101.10	3.42	3.95E-02	10.79
7	141.066	0.78	$[M+H]^+$	$C_6H_8N_2O_2$	咪唑丙酸	—	0.42	2.88E-03	5.50
8	145.015	0.98	$[M-H]^-$	$C_5H_6O_5$	氧戊二酸	101.0247, 73.0288, 57.0349	6.50	1.08E-02	4.88

(续表 1)

序号	质荷比 (<i>m/z</i>)	保留时间 (<i>t</i> /min)	加和离子	分子式	代谢物	碎片离子	FC (U5/U0)	<i>P</i> 值	QC (RSD, %)
	101.025	0.98			氧戊二酸碎片	57.03	5.79	1.23E-02	10.07
9	167.0219	0.99	[M-H] ⁻	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸	—	0.65	1.59E-02	5.84
10	164.057	0.99	[M-H] ⁻	C ₆ H ₇ N ₅ O	7-甲基鸟嘌呤	—	0.20	4.08E-03	4.80
11	117.020	1.13	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄	琥珀酸	99.0083, 73.0299, 55.0191	4.77	5.97E-03	7.85
12	184.060	1.29	[M+H] ⁺	C ₈ H ₉ NO ₄	4-吡哆酸	166.0496, 148.0387, 120.0436, 92.0471	0.48	2.87E-03	3.07
	182.046	1.29	[M-H] ⁻	C ₈ H ₉ NO ₄	4-吡哆酸	138.03	0.48	7.76E-04	7.27
13	142.051	1.87	[M-H] ⁻	C ₆ H ₉ NO ₃	乙烯乙酰甘氨酸	98.0613, 82.0030, 74.0252, 56.0153	2.24	5.08E-03	6.30
14	166.072	1.87	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-苯丙氨酸	149.0591, 131.0484, 120.0808	6.51	1.52E-02	10.16
15	205.097	3.77	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-色氨酸	188.0710, 146.0609, 118.0657	5.68	1.25E-02	14.36
16	172.992	4.23	[M-H] ⁻	C ₆ H ₆ O ₄ S	硫酸苯酯	93.0358, 79.9566	2.33	3.21E-02	12.53
17	129.056	5.45	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₀ O ₃	2-酮己酸	—	6.27	8.77E-03	19.94
18	232.118	6.29	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅	异戊酰谷氨酸	214.1064, 186.1122, 168.1011, 157.0871, 83.0861, 69.0711, 55.0546	0.43	1.19E-02	2.99
19	201.113	8.25	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	癸二酸	57.0350, 139.1129, 183.1032	0.48	4.90E-04	1.24
	203.128	8.26	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	癸二酸	—	0.49	3.49E-03	2.44
20	165.056	8.48	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₃	苯乳酸	72.9940, 103.0559, 119.0499, 147.0458	0.19	1.76E-02	5.39
21	171.102	9.11	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₃	氧代壬酸	153.0922, 127.1126, 97.0658, 73.0295	4.12	4.36E-03	8.40

注：“—”表示缺失碎片离子

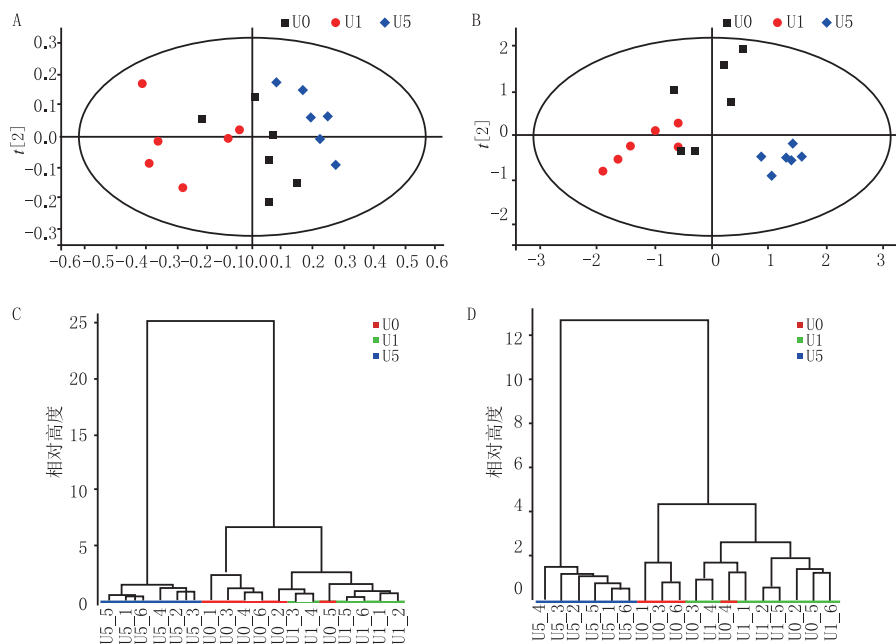


图5 尿液正、负离子模式下的U0组、U1组和U5组的聚类分析

A. 正离子模式下3组PCA得分图; B. 负离子模式下3组PCA得分图; C. 正离子模式下3组聚类树状图; D. 负离子模式下3组聚类树状图

如表 1 所示,与对照组(U0)相比,模型组(U1、U5)尿液中代谢物有 11 种显著下调,10 种显著上调。其中,三甲基赖氨酸、尿酸、苏氨酸、苯乳酸、牛磺酸、4-吡啶酸显著下调;琥珀酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨

酸、氧代壬酸和脂肪酰基甘氨酸显著上调。为了直观地展现差异物质在 3 组中的变化趋势,笔者使用 Metaboanalyst 软件(<http://www.metaboanalyst.ca>)绘制热图(图 7)。

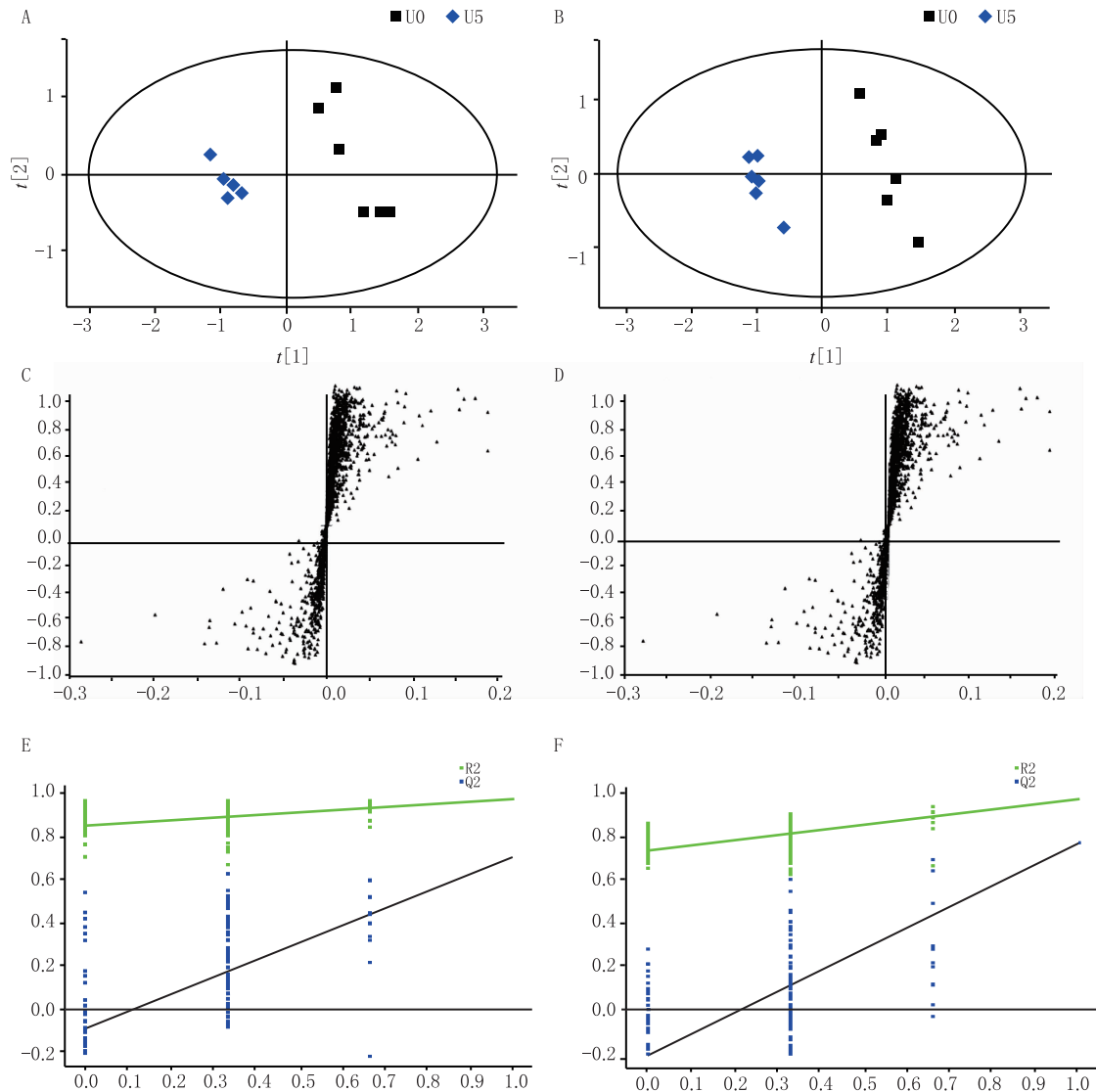


图 6 U0 和 U5 组尿液正、负离子模式下偏最小二乘法判别分析
A. 正离子模式下得分图;B. 负离子模式下得分图;C. 正离子模式下 S-Plot 图;
D. 负离子模式下 S-Plot 图;E. 正离子模式下排列测试图;F. 负离子模式下排列测试图

3 讨论

对筛选出的 21 种差异代谢物建立代谢相关网络(图 8),涉及的通路有氨基酸代谢、能量代谢、牛磺酸代谢、次牛磺酸代谢、VB 代谢和嘌呤代谢等。

模型组尿液中芳香族氨基酸(AAA)苯丙氨酸和色氨酸明显升高,表明在结晶肾损伤过程中 AAA 代谢受到干扰,这与肾脏疾病跟 AAA 降解、合成或排泄密切相关^[24-25]。牛磺酸是哺乳动物细胞中一种重要的含硫 β -氨基酸^[26],被认为是一种内源性抗氧化剂和膜稳定剂。许多研究已经证明牛磺酸对多

种类型肾损伤的保护作用,包括缺血/再灌注损伤、高血糖、氧化应激和外源性物质造成的损伤^[27]。而模型组中牛磺酸显著下降,表明牛磺酸和次牛磺酸代谢在结晶损伤过程中受到干扰。

脂肪酰甘氨酸作为脂肪酸的代谢产物,由乙酰辅酶 A(acyl-CoA)与甘氨酸在线粒体酶甘氨酸 N-酰基转移酶(glycine N-acyltransferase)的催化作用下产生^[28]。而在一些有机酸血症中,由于甘氨酸 N-酰基转移酶的高亲和力,一些 acyl-CoA 与甘氨酸的结合优于与卡尼汀的结合^[29],从而影响线粒体内脂肪酸的 β 氧化^[30-32]。本研究中,模型组尿液中的

乙烯乙酰甘氨酸显著上升,表明乙醛酸盐诱导的结晶肾损伤过程中脂肪酸β氧化可能出现障碍,而脂肪酸β氧化异常会导致脂质过氧化和氧自由基的产

生,这也与ROS的累积与肾小管细胞的损伤以及钙盐的附着有重要关系结论^[33-35]相一致。

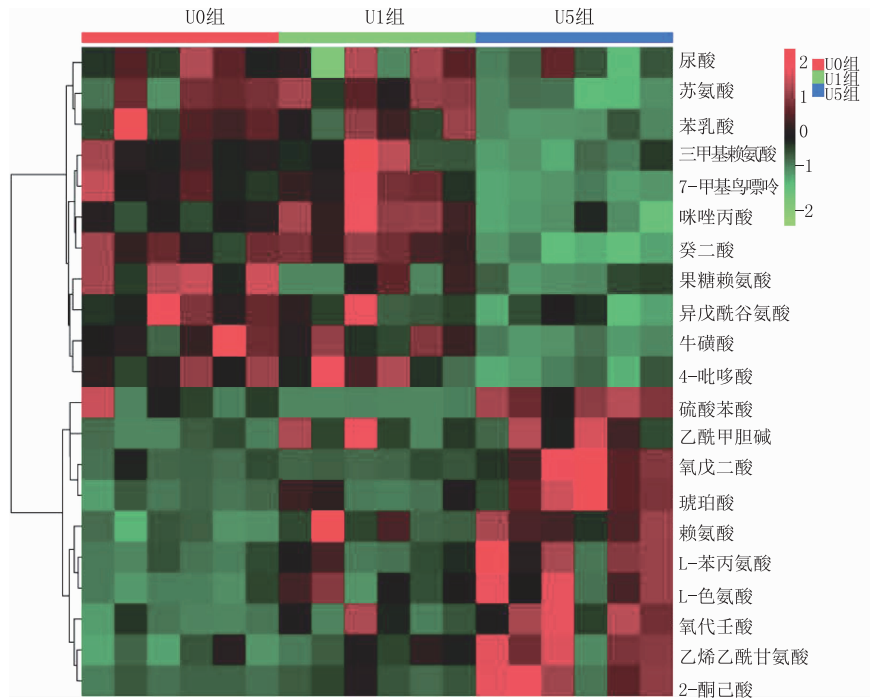


图7 尿液中21种差异物质聚类分析热图
注:红色越深代表量越高,绿色越深代表量越低

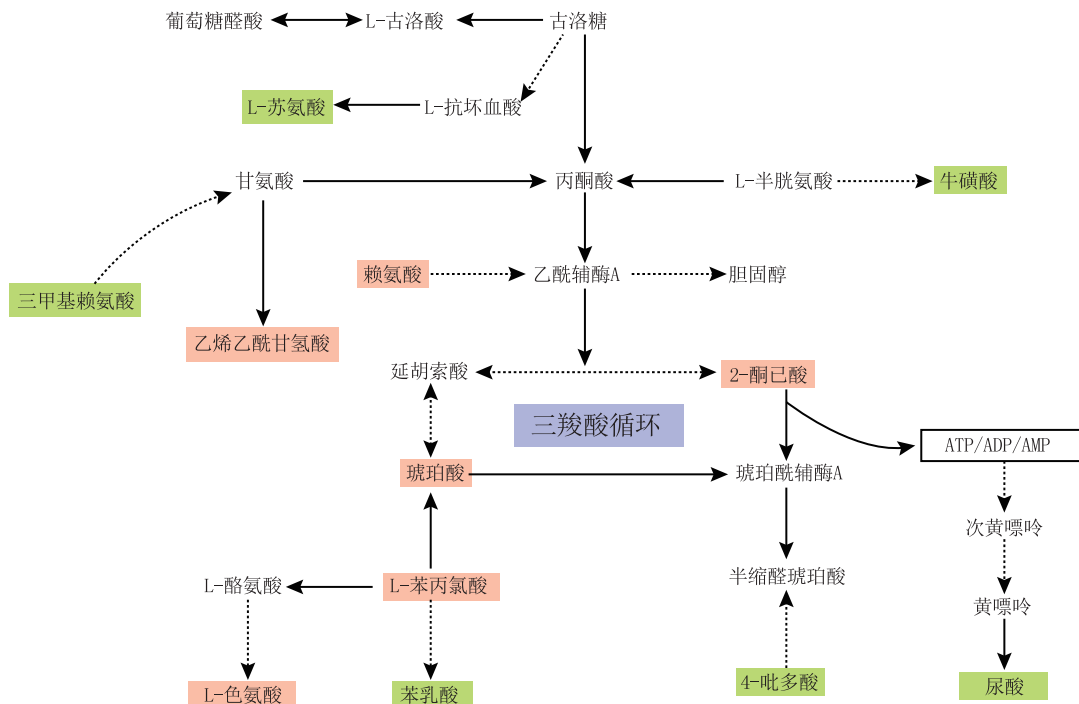


图8 乙醛酸盐诱导的小鼠结晶肾损伤尿液显著差异代谢物代谢网络图
注:红色表示上调,绿色表示下调

4-吡哆酸是VB₆的重要代谢产物,VB₆转化成4-吡哆酸后排出体外。VB₆可以通过减少草酸的内源性合成抑制草酸钙结晶的形成,多项研究表明补

充VB₆可以减少尿液中草酸的排泄^[36-39]。内源性草酸可以经甘氨酸-乙醛酸-草酸^[40]途径合成。VB₆是氨基酸代谢中转氨酶的辅酶^[38],大量VB₆存在时,

乙醛酸可以在丙氨酸乙醛酸氨基转移酶(alanine glyoxylate aminotransferase, AGT)催化下氨基化, 转化成甘氨酸, 减少草酸的生成, 而乙醛酸的上游代谢物乙醇酸也会转化为 VB₆。本研究中, 小鼠给予乙醛酸后, 4-吡哆酸的含量在尿液中显著下降, 表明存在大量乙醛酸时干扰 VB₆ 的代谢。

尿酸是嘌呤代谢中的重要物质, 在机体内, 次黄嘌呤可以被代谢为黄嘌呤, 而黄嘌呤可以被继续代谢为尿酸。本研究中, 模型组尿样中尿酸的含量下降表示尿酸经肾脏的排泄发生障碍。作为嘌呤代谢的重要下游产物, 尿酸对肾脏疾病的影响存在很大争议。有报道称尿酸对慢性肾脏病(CDK)的进展是一个潜在的重要风险因素, 也有一些研究表明, 可溶性尿酸作为一种强大的抗氧化剂, 可以发挥其保护作用^[41-43]。虽然尿酸的作用在本文中无法很好的阐述, 但可以说明在此模型结晶形成过程中嘌呤代谢受到了强烈干扰, 给继续研究其机制以及标志物的筛选提供了重要参考。

本研究中, 课题组利用乙醛酸盐诱导的小鼠结晶肾损伤模型, 采用基于 UPLC-Q-TOF/MS 的代谢组学方法从尿液中筛选出 21 个差异代谢物, 主要涉及氨基酸代谢、能量代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、嘌呤代谢和 VB₆ 代谢, 为疾病机制研究以及早期标志物的筛选提供了重要参考, 但要阐明疾病的具体机制可能还需要结合蛋白质组学数据。

【参考文献】

- [1] XU H, ZISMAN A L, COE F L, et al. Kidney stones: an update on current pharmacological management and future directions [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2013, 14 (4): 435-447.
- [2] ROMERO V, AKPINAR H, ASSIMOS D G. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors [J]. *Rev Urol*, 2010, 12(2-3): e86-e96.
- [3] ZENG G H, MAI Z L, XIA S J, et al. Prevalence of kidney stones in China: an ultrasonography based cross-sectional study [J]. *BJU Int*, 2017, 120: 109-116.
- [4] SUTHERLAND J W, PARKS J H, COE F L. Recurrence after a single renal stone in a community practice [J]. *Miner Electrolyte Metab*, 1985, 11(4): 267-269.
- [5] RULE AD, BERGSTRALH E J, MELTON L J, et al. Kidney stones and the risk for chronic kidney disease [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(4): 804-811.
- [6] EL-ZOGHBY Z M, LIESKE J C, FOLEY RN, et al. Urolithiasis and the risk of ESRD [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7 (9): 1409-1415.
- [7] JOHNSON C M, WILSON D M, OFALLON WM, et al. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota [J]. *Kidney Int*, 1979, 16(5): 624-631.
- [8] VERVAET B A, VERHULST A, DAUWE SE, et al. An active renal crystal clearance mechanism in rat and man [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(1): 41-51.
- [9] KHAN S R. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations [J]. *J Urol*, 2013, 189(3): 803-811.
- [10] KHAN S R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis [J]. *Transl Androl Urol*, 2014, 3 (3): 256-276.
- [11] TASCA A. Metabolic syndrome and bariatric surgery in stone disease etiology [J]. *Curr Opin Urol*, 2011, 21(2): 129-133.
- [12] MOHAMMADJAFARI H, BARZIN M, SALEHIFAR E, et al. Etiologic and epidemiologic pattern of urolithiasis in north iran; review of 10-year findings [J]. *Iran J Pediatr*, 2014, 24 (1): 69-74.
- [13] NICHOLSON J K, LINDON J C, 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.
- [14] ROCHFORD S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68 (12): 1813-1820.
- [15] OKADA A, NOMURA S, HIGASHIBATA Y, et al. Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection [J]. *Urol Res*, 2007, 35(2): 89-99.
- [16] 高松燕. 基于两种动物模型的结晶肾损伤形成机制及中药干预的代谢组学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2015.
- [17] CHAN E C, PASIKANTI K K, NICHOLSON J K. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6 (10): 1483-1499.
- [18] SMILDE A K, van der WERF M J, BIJLSMA S, et al. Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(20): 6729-6736.
- [19] TRYGG J, HOLMES E, LUNDSTEDT T. Chemometrics in metabolomics [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-479.
- [20] WANG X, WANG H, ZHANG A, et al. Metabolomics study on the toxicity of aconite root and its processed products using ultraperformance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and ingenuity pathways analysis [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(2): 1284-1301.
- [21] WISHART D S, JEWISON T, GUO A C, et al. HMDB 3.0 The Human Metabolome Database in 2013 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D801-D807.
- [22] IANG X, CHEN X, LIANG Q, et al. Metabonomic study of Chinese medicine Shuanglong formula as an effective treatment for myocardial infarction in rats [J]. *J Proteome Res*,

- 2011,10(2):790-799.
- [23] 高越. 基于组学和网络药理学的养心氏片抗心衰作用机理研究[D]. 上海:第二军医大学,2016.
- [24] BOIRIE Y, ALBRIGHT R, BIGELOW M, et al. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 591-596.
- [25] YOUNG B A, VON KORFF M, HECKBERT S R, et al. Association of major depression and mortality in Stage 5 diabetic chronic kidney disease [J]. *Gen Hosp Psychiatry*, 2010, 32(2):119-124.
- [26] KERAI M D, WATERFIELD C J, KENYON S H, et al. Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats[J]. *Alcohol Alcohol*, 1999, 34(4):529-541.
- [27] GUAN X, DEI-ANANE G, LIANG R, et al. Donor preconditioning with taurine protects kidney grafts from injury after experimental transplantation[J]. *J Surg Res*, 2008, 146(1): 127-134.
- [28] BADENHORST C P, van der SLUIS R, ERASMUS E, et al. Glycine conjugation: importance in metabolism, the role of glycine N-acyltransferase, and factors that influence interindividual variation[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(9):1139-1153.
- [29] WILCOX B J, RITENOUR-RODGERS K J, ASSER A S, et al. N-acylglycine amidation: implications for the biosynthesis of fatty acid primary amides[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(11): 3235-3245.
- [30] COSTA C G, GUERAND W S, STRUYS E A, et al. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 21(6):1215-1224.
- [31] OMBRONE D, SALVATORE F, RUOPPOLO M. Quantitative liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry analysis of urinary acylglycines: application to the diagnosis of inborn errors of metabolism[J]. *Anal Biochem*, 2011, 417(1):122-128.
- [32] LA MARCA G, RIZZO C. Analysis of organic acids and acylglycines for the diagnosis of related inborn errors of metabolism by GC- and HPLC-MS[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 708: 73-98.
- [33] KHAN S R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis [J]. *Transl Androl Urol*, 2014, 3(3):256-276.
- [34] KHAN S R. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones[J]. *Urol Res*, 2006, 34(2):86-91.
- [35] KHAN S R. Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2004, 98(2):e55-e60.
- [36] SCHEINMAN J I, VOZIYAN P A, BELMONT J M, et al. Pyridoxamine lowers oxalate excretion and kidney crystals in experimental hyperoxaluria; a potential therapy for primary hyperoxaluria[J]. *Urol Res*, 2005, 33(5):368-371.
- [37] MITWALLI A, AYIOMAMITIS A, GRASS L, et al. Control of hyperoxaluria with large doses of pyridoxine in patients with kidney stones [J]. *Int Urol Nephrol*, 1988, 20(4): 353-359.
- [38] MILLINER D S, EICKHOLT J T, BERGSTRALH E J, et al. Results of long-term treatment with orthophosphate and pyridoxine in patients with primary hyperoxaluria[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(23):1553-1558.
- [39] ORTIZ-ALVARADO O, MIYAOKA R, KRIEDBERG C, et al. Pyridoxine and dietary counseling for the management of idiopathic hyperoxaluria in stone-forming patients[J]. *Urology*, 2011, 77(5):1054-1058.
- [40] DIJCKER J C, PLANTINGA E A, van BAAL J, et al. Influence of nutrition on feline calcium oxalate urolithiasis with emphasis on endogenous oxalate synthesis[J]. *Nutr Res Rev*, 2011, 24(1):96-110.
- [41] JOHNSON R J, SANCHEZ-LOZADA L G, MAZZALI M, et al. What are the key arguments against uric acid as a true risk factor for hypertension [J]. *Hypertension*, 2013, 61(5): 948-951.
- [42] ROMERO F, PEREZ M, CHAVEZ M, et al. Effect of uric acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - role of matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 105(6):416-424.
- [43] SHIMADA M, JOHNSON RJ, MAY W S Jr, et al. A novel role for uric acid in acute kidney injury associated with tumour lysis syndrome[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(10):2960-2964.

[收稿日期] 2018-11-16 [修回日期] 2018-12-17

[本文编辑] 李睿旻