

中药特异质肝损伤易感因素的代谢组学研究: 以何首乌制剂为例

周元园^{1,2†}, 牛明^{2†}, 涂灿^{1,2}, 卫璐戈², 葛斐林², 张乐^{1,2}, 王肖辉², 李春雨³, 刘晓熠², 张雅铭², 唐怡^{1*}, 肖小河², 王伽伯^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;

2. 解放军302医院全军中医药研究所, 北京 100039;

3. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: wjb0128@126.com; tangyi0127@126.com

2018-10-08 收稿, 2018-11-17 修回, 2018-11-19 接受, 2019-01-22 网络版发表

国家重大新药创制专项(2015ZX09501-004-001-008)、国家自然科学基金(81503247)、北京市科技新星计划(Z16111000490000)、国家公益性行业专项(201507004-04)和国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-BJ-07)资助

摘要 药物特异质肝损伤的易感机制是当前临床毒理学研究的难点。本研究以何首乌制剂——润燥止痒胶囊为例, 结合临床病例分析, 采用代谢组学探讨其肝损伤可能的易感机制。病例分析表明润燥止痒胶囊相关肝损伤具有较典型的特异质属性, 且与免疫异常活化有关。在正常小鼠上, 灌胃润燥止痒胶囊对肝功能生化指标和肝组织病理无显著影响; 在易感模型小鼠, 免疫应激造模因素并未引起肝损伤表型, 仅伴随肝组织少量炎症免疫细胞浸润, 但从代谢组学可见组氨酸和丙氨酸等代谢通路显著上调($P<0.01$)和色氨酸等代谢通路显著下调($P<0.01$), 提示代谢重编程可能是其肝损伤易感因素的重要内在机制; 而在免疫应激易感因素基础上, 灌胃润燥止痒胶囊引起了显著的肝损伤表型, 并伴有肝组织大量炎症免疫细胞浸润和炎症反应, 同时代谢组学上亦表现为花生四烯酸、亚油酸、甘油磷脂、胆汁酸等与炎症相关代谢通路的显著改变。综合提示代谢重编程可能是药物特异质肝损伤易感性的的重要机制之一。基于易感因素相关的代谢紊乱通路, 筛选发现了亚油酸、骨化二醇、18-羟基皮质酮等10个生物标志物可较好地识别易感模型动物(ROC分析中AUC均大于0.9), 对临床识别易感人群具有潜在的应用价值。

关键词 药物特异质肝损伤, 何首乌, 易感因素, 免疫应激, 代谢组学, 代谢重编程

随着中草药在国内外的广泛使用, 近年来以肝损伤为代表的中药安全性问题/事件频被报道, 特别是一些传统不认为有毒的中药有较多的肝损伤报道^[1,2], 其中以何首乌较为突出^[1]。至今国际上已有美国、韩国等30余个国家和地区报道了何首乌及其制剂的肝损伤问题, 引起国内外众多医疗机构和民众的广泛关注。此外, 国外多国药监部门先后发布了何首乌肝损伤警告信息。2006, 2013和2014年我国药监

部门也多次发布了含何首乌制剂肝损伤警示和监管通告, 包括养血生发胶囊、首乌丸、首乌片、首乌延寿片、首乌延寿颗粒等。研究表明, 中药何首乌及其制剂在正常动物上即使大剂量、长期给药也难以做出肝损伤表型; 而临床上确实在少数易感个体发生肝损伤, 但个体差异极大, 具有明显的特异质(idiosyncratic)属性^[2]。药物特异质肝损伤的易感因素有哪些? 其损伤机制是什么? 这些问题尚缺少深入

引用格式: 周元园, 牛明, 涂灿, 等. 中药特异质肝损伤易感因素的代谢组学研究: 以何首乌制剂为例. 科学通报, 2019, 64: 948–962

Zhou Y Y, Niu M, Tu C, et al. Metabolomic study on the susceptible factors of idiosyncratic Traditional Chinese Medicine-induced liver injury: Exemplification of a *Polygonum multiflorum* preparation (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 948–962, doi: 10.1360/N972018-00995

的研究,是国内外毒理学研究的难点和热点.因此,以何首乌制剂为例,探讨中药肝毒性的易感因素和损伤机制,对提高中药特异质肝损伤的认知水平,科学指导临床安全用药具有重要的理论和现实意义.

润燥止痒胶囊由生何首乌、制何首乌、生地黄等6种中药组成,具有养血滋阴、祛风止痒、润肠通便等功效;作为临床治疗慢性湿疹、荨麻疹、痤疮等皮肤类疾病的常用中成药,文献[3]报道其具有较好的临床疗效.然而,近年来有研究报道润燥止痒胶囊具有肝损伤风险^[4-6].润燥止痒胶囊作为典型含有何首乌的制剂,其相关肝损伤问题引起国家药监机构和公众的高度关注.课题组前期的临床病例分析提示何首乌肝损伤具有特异质属性^[7],并且其特异质属性可能与机体的免疫应激状态高度相关.课题组进一步在免疫应激动物模型上证实了何首乌肝损伤的客观真实性及特异质属性^[8],并发现顺式二苯乙烯苷等为其重要的易感物质^[9].在此基础上,课题组建立了免疫应激介导的何首乌特异质肝损伤评价方法和模型,并揭示了何首乌免疫特异质肝损伤“三因致毒”机制^[10].该机制相继在其他有肝损伤报道的中药如淫羊藿、补骨脂及其制剂(壮骨关节丸等)的安全性再评价研究中得到证实^[11].

为此,本文以润燥止痒胶囊为例,从临床肝损伤病例分析切入,结合前期课题组构建的何首乌特异质肝损伤易感动物模型,探讨润燥止痒胶囊导致特异质肝损伤的客观性,同时结合代谢组学方法筛选其肝损伤易感因素相关的生物标志物,从代谢重编程的角度,探讨易感状态下代谢通路紊乱及其与机体代谢-免疫重构、肝损伤过程的相关性,以期为何首乌制剂的临床合理用药及机制研究提供参考依据.

1 材料与方法

(i) 病例数据来源. 检索中国人民解放军第302医院药物性肝损伤病例数据库、中国知网和维普等文献数据库以及相关药品不良反应报告,收集润燥止痒胶囊肝损伤的病例,所有的病例均采用中华中医药学会《中草药相关肝损伤临床诊疗指南》及国家药品监督管理局《中药药源性肝损伤临床评价技术指导原则》进行评价与纳入,并采用回顾性分析进行统计分析.

(ii) 动物. 健康雄性C57小鼠,SPF级,6周,体重 18 ± 20 g,60只,购于斯贝福实验动物科技有限公

司[合格证号SCXK(京)2016-0002].分笼饲养于解放军第302医院实验动物中心.饲养环境:湿度50%~60%,温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,明暗周期12 h/12 h.

(iii) 仪器和试剂. Agilent 6550 Q-TOF LC/MS System质谱仪(Agilent Technologies,美国);低温离心机(美国Thermo Fisher Scientific Sigma公司);Nikon E200光学显微镜(日本Nikon公司);SynergyH2多功能微孔板检测仪(美国BioTek公司);微量分析天平(Mettler Toledo AL204瑞士);Leica 2016石蜡切片机(上海莱卡仪器有限公司);Leica EG1150组织包埋机等.

润燥止痒胶囊(批号:1706032)购于国药集团同济堂(贵州)制药有限公司,临用前用0.5%的羧甲基纤维素钠制成混悬液备用;甲醇(色谱级,美国Fisher公司);纯净水(娃哈哈集团有限公司);脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)购于sigma公司(批号:086M4159V);福尔马林(批号:No.2017121B, Solarbio公司);羧甲基纤维素钠(批号:1002222,西陇化工股份有限公司);丙氨酸氨基转移酶(GPT/ALT)试剂盒(批号:20180403,南京建成生物工程研究所),天冬氨酸氨基转移酶(GOT/AST)试剂盒(批号:20180402,南京建成生物工程研究所).

(iv) 动物分组和给药. C57小鼠60只,随机均分为6组:正常对照组(N)、正常低剂量组(NL)、正常高剂量组(NH)、模型组(M)、模型低剂量组(ML)、模型高剂量组(MH).低剂量为 1.56 g kg^{-1} 、高剂量为 4.68 g kg^{-1} (何首乌生药量为 $1.7347, 5.2039\text{ g kg}^{-1}$).模型组、模型低剂量组、模型高剂量组,尾静脉注射LPS溶液(0.5 mg kg^{-1});正常给药组,尾静脉注射生理盐水($10\text{ }\mu\text{L g}^{-1}$).2 h后,各给药组灌胃给予对应剂量的润燥止痒胶囊混悬液.

(v) 样本收集. 灌胃润燥止痒胶囊混悬液6 h后,摘眼球取血, 4°C , 3500 r min^{-1} ,离心10 min,分离血浆, -80°C 保存;取小鼠左侧肝叶部分于4%中性多聚甲醛溶液中固定72 h.

(vi) 肝功能指标检测和肝脏病理学检查. 按试剂盒说明书测定并计算血清ALT和AST的活力值.肝组织HE染色,显微镜下观察病理切片.

(vii) 代谢组学血浆样品处理. 精密吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 小鼠血浆,加入3倍量预冷的甲醇,涡旋混匀, 4°C , 12000 r min^{-1} 离心10 min,吸取上清液 $100\text{ }\mu\text{L}$,旋转蒸发,再加入等体积75%的甲醇复融,即为备用样品;同时吸取每个样本上清液 $10\text{ }\mu\text{L}$,混匀,分装200

$\mu\text{L}/\text{管}$, 同法制备, 即为质控样品(QC).

(viii) 代谢组学色谱及质谱条件. 色谱柱: Agilent ZORBBOXRRHD C18柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm). 流动相A: 水(0.1%甲酸), 流动相B: 乙腈(0.1%甲酸), 流速: 0.30 mL min⁻¹, 进样量: 4 μL . 检测波长: 全波长扫描190~400 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 样品温度: 4 $^{\circ}\text{C}$; 色谱梯度洗脱条件: 100%(A), 0~1 min; 100%~60%(A), 1~9 min; 60%~10%(A), 9~19 min; 10%~0%(A); 19~21 min; 100%(B), 21~25 min. 采用Agilent 6550 Q-TOF/MS的电喷雾电离源(ESI). 电喷雾源参数如下: 电喷雾毛细管电压: 3.5 kV(负离子模式), 3.5 kV(正离子模式). 质量范围设定为80~1000 m/z , 气体温度: 225 $^{\circ}\text{C}$ (负离子), 225 $^{\circ}\text{C}$ (正离子), 气流为13 L min⁻¹. 雾化器设定为20 psig(阴性)和20 psig(阳性). 鞘气温度: 275 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流量: 12 L min⁻¹, 喷嘴电压: 2000 V. 质量校准: 参考质量121.0509(嘌呤)和922.0098(HP-0921)以正离子模式使用, 112.9856(TFANH₄)和1033.9881(TFANH₄+HP-0921)以负离子模式使用.

(ix) 数据处理统计学分析. 代谢组学采用美国Agilent公司Mass Hunter工作站进行色谱峰提取. 然后将色谱峰的峰面积导入MetaboAnalyst3.0软件进行标准化处理, 筛选出具有显著性差异的变量($P<0.05$ 且倍数变化 >1.5 或 <0.5), 并将其导入SIMCA-P-13.0软件进行主成分分析(PCA)和正交校正偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA). 使用MetaboAnalyst3.0, Mass Hunter PCDL Manager软件、KEGG等生物学数据库进行生物标志物的鉴定和代谢通路分析. 将色谱峰面积导入MetaboAnalyst3.0软件进行受试者操作特性曲线(ROC)分析, 假阳性率为横坐标, 真阳性率为纵坐标, 计算曲线下面积(AUC), AUC >0.9 则表明变量区分组间差异的灵敏度与特异性较好, 有较好的诊断价值. 此外, 采用SPSS 18.0进行统计分析, 实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较, 以 $P<0.05$ 或者 $P<0.01$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 临床肝损伤相关病例分析

经检索与评价得到28例润燥止痒胶囊相关肝损伤病例. 病例分析显示: 男女比例为1:1.55; 发病年

龄段集中于20~40岁(12例, 42.86%); 40~80岁年龄段女性患者多于男性; 用药目的以瘙痒症、皮炎、湿疹等免疫异常活化疾病为主; 临床表现以乏力、纳差为常见, 肝损伤程度以严重不良反应居多(83.33%); 绝大部分患者预后较好, 但有1例死亡; 肝功能指标ALT, AST水平中位值大于正常范围上限值的5倍, 总胆红素(TBIL)水平中位值大于正常范围上限值的3倍. 单用润燥止痒胶囊导致肝损伤的病例有17例(60.7%), 其中有2例再激发事件. 此外, 用药累积剂量集中在96 g, 服药到发生肝损伤的时间中位数为30 d, 单个患者用药累积剂量及服药时间之间有明显差异, 其导致的肝损伤无明显的量效关系. 结果提示, 润燥止痒胶囊可以引起肝损伤, 损伤程度较严重, 其肝损伤的发生无明显的量效关系, 具有较典型的特异质肝损伤的特征. 此外, 润燥止痒胶囊相关肝损伤多发生于瘙痒症、皮炎、湿疹等免疫异常活化疾病患者, 提示免疫异常活化可能是其导致特异质肝损伤的易感因素之一(图1).

2.2 小鼠血浆生化指标

在AST, ALT指标中, ML, NH, NL与N及M组相比, 均无统计学意义($P>0.05$); 与M组比较, MH组小鼠血浆生化指标ALT和AST显著性升高($P<0.01$). 提示, 在免疫应激状态下, 润燥止痒胶囊具有肝损伤作用(图2(a), (b)).

2.3 小鼠肝脏组织病理改变

N组小鼠肝组织结构清晰, 肝细胞排列均匀、形态完好, 无炎性细胞浸润, 无组织学病变. 与N组比较, NL, NH组肝组织结构清晰, 无明显的炎性细胞浸润, 没有观察到明显的组织病理学改变; M组肝组织汇管区有轻度的炎性细胞浸润; ML组肝组织汇管区亦有轻度的炎性细胞浸润; MH组肝组织中可见明显的肝损伤, 提示在免疫应激状态下, 润燥止痒胶囊具有肝损伤作用(图2(c)).

2.4 代谢组学PCA和OPLS-DA分析

对正、负离子模式下的生物体内代谢产物进行PCA分析和OPLS-DA分析. PCA分析所示(图3(a), (b)), 在正、负离子模式下, QC样本分布集中并聚集在得分矩阵投影图中间附近位置, 表明整个分析过程中LC/MS系统是稳定的. 此外, 正负两种离子模式

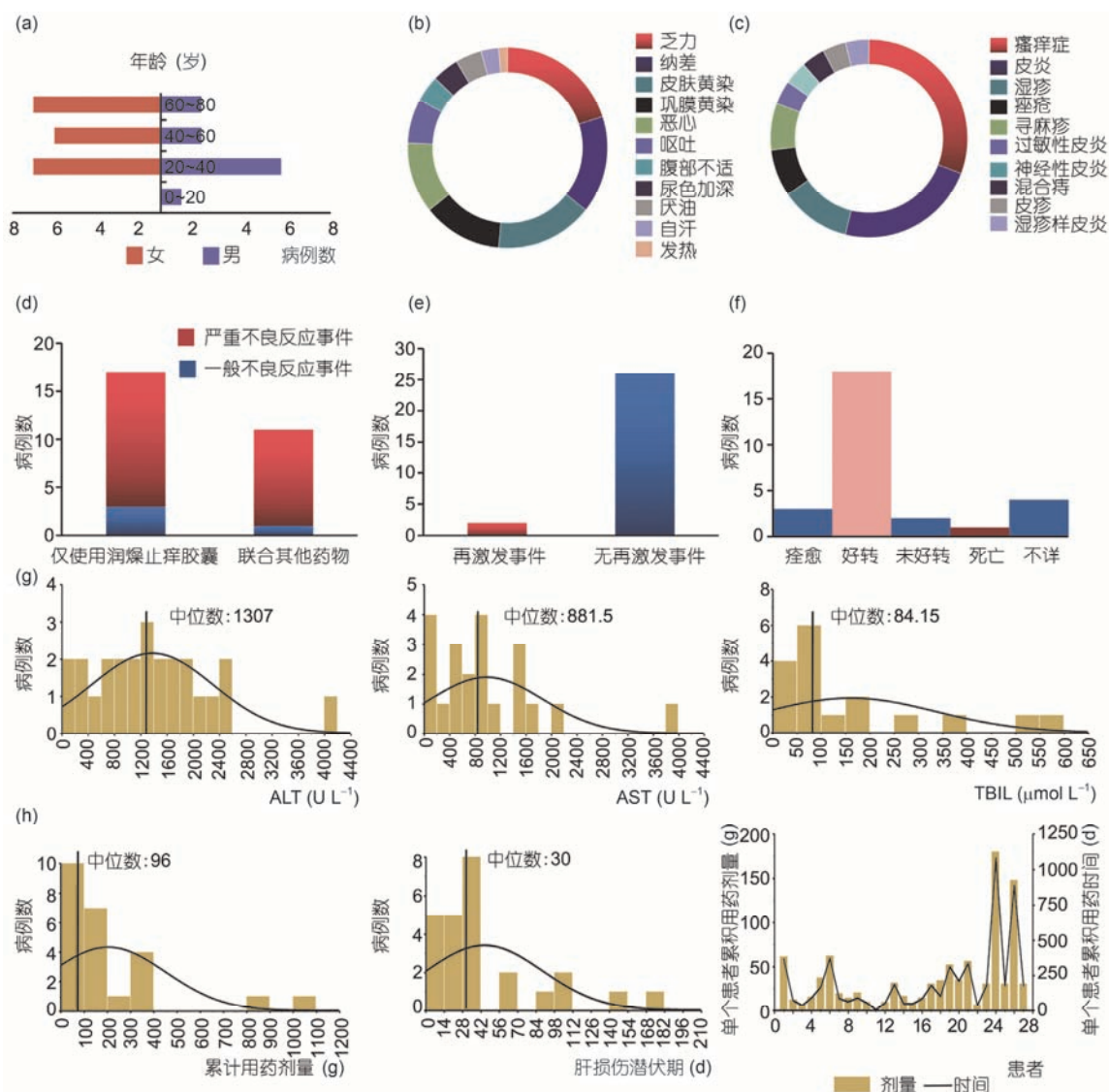


图1 润燥止痒胶囊相关肝损伤临床病例特征分析。(a) 性别与年龄;(b) 临床特征;(c) 用药目的;(d) 药物配伍;(e) 再激发事件的发生;(f) 预后情况;(g) 生化指标;(h) 用药累积剂量, 肝损伤潜伏期, 单个患者的用药时间与累积剂量

Figure 1 Analysis of clinical features of liver injury related to Runzaozhiyang capsule. (a) Gender and age; (b) clinical symptoms; (c) purposes of using medicines; (d) drug compatibility; (e) reexcitation of events; (f) prognosis; (g) biochemical indicators; (h) the cumulative dose of using medicine, the latency of liver injury, the duration of drug use in individual patients and the cumulative dose of using drug

下, N, NL, NH, M, ML和MH组间能较好区分, 表明不同生理状态下小鼠体内代谢轮廓各异. 图中MH组距离N组最远, 提示MH组小鼠体内代谢轮廓具有明显差异性, 表明LPS联合高剂量润燥止痒胶囊具有明显的肝损伤性质.

为了进一步区分不同状态下小鼠生理代谢环境的差异, 通过使用有监督的模式识别方法OPLS-DA进行分析. 如图3(c)得分矩阵投影图所示, 在正离子模式下, N和M组、M和MH组、N与NH组之间可明显

区分, 分别位于纵坐标两侧, 提示不同生理状态小鼠代谢环境的影响有显著差异.

在建立OPLS-DA模型基础上, 将N和M组、M和MH组、N与NH组两组间的变量, 通过S-polt分析及单变量分析, 选择VIP>1, $|P(\text{corr})| \geq 0.5$, $P < 0.05$ 且倍数变化(FC)>1.5或者<0.5的变量作为两组间的差异变量. 将上述筛选出的N和M组、M和MH组、N与NH组差异变量通过韦恩图分析, 可得到差异变量在不同对照组间的分布情况(图3(d)), 其中, N和M组相比,

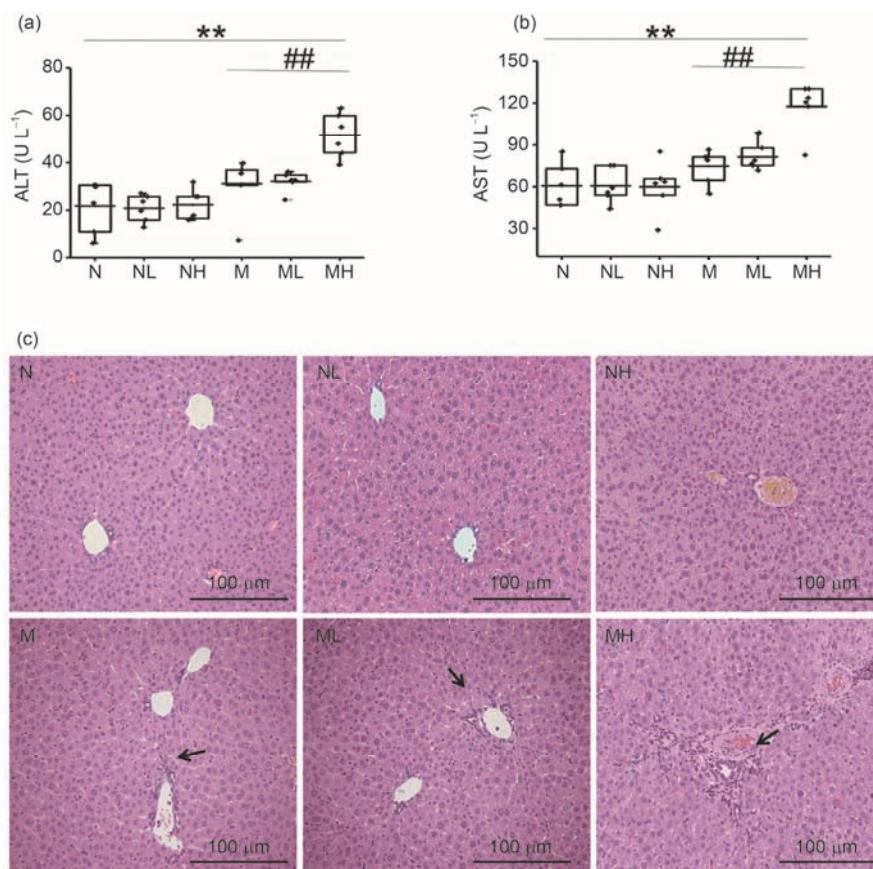


图 2 小鼠血浆生化指标及肝组织HE染色分析. (a) 丙氨酸氨基转移酶. (b) 天冬氨酸氨基转移酶. 总数=6, 算数平均值 $\pm$ 标准差. 与正常组相比** $P<0.01$, 与模型组相比## $P<0.01$. (c) 肝脏组织病理学改变. HE染色($\times 200$), 箭头指示炎性细胞浸润. N, 正常对照组; NL, 正常低剂量给药组; NH, 正常高剂量给药组; M, 模型组; ML, 模型低剂量给药组; MH, 模型高剂量给药组

Figure 2 Analysis of plasma biochemical index and HE staining of liver tissue in mice. (a) ALT; (b) AST. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs N; ## $P<0.01$ vs M. (c) histopathological changes of the liver. Arrows indicate inflammatory cell infiltration. HE staining ($\times 200$). N: Normal control group; NL: Normal group treated with low dose Runzaozhiyang solution; NH: Normal group treated with high dose Runzaozhiyang solution; M: Model group; ML: Model group treated with low dose Runzaozhiyang solution; MH: Model group treated with high dose Runzaozhiyang solution

有1277个差异变量; M和MH组相比, 有751个差异变量; N与NH组相比, 有2067个差异变量. 将上述筛选出的N和M组、M和MH组、N与NH组差异变量的并集通过热图分析, 可得到差异变量在N, M, NH, MH组的含量区别较为明显(图3(e)).

2.5 代谢组学生物标志物筛选和通路富集分析

上述筛选得到的N和M组两组间的差异变量, 由于其仅受LPS的影响, 故可认为其与特异质肝损伤易感性高度相关. 通过PCA分析, 可见N, NH与M, MH组位于Y轴两侧, 区分明显(图4(a)), 表明造模前后其生理代谢环境改变明显. 最后将差异变量借助 Mass Hunter PCDL Manager数据库中的准确质荷比进行结构解析, 真实Mass tolerance质量误差限定为10 ppm,

最终筛选出有代谢通路并与动物实验表型匹配的15个生物标志物(表1), 包括褪黑素、L-苯丙氨酸、L-鸟氨酸、 β -丙氨酸、L-亮氨酸、骨化二醇、 γ -亚油酸等, 其涉及的代谢通路包括: 氨基酸、类固醇激素、亚油酸等. 选取上述生物标志物中 γ -亚油酸、L-组氨酸、L-脯氨酸、褪黑素、3-吡啶乙酸进行二级质谱验证(图4(c)), 通过比对对照品及Metlin数据库中对应化合物的二级标准质谱的特征峰、保留时间与质荷比, 发现二级质谱鉴定的化合物基本与对照品一致, 故说明实验中一级质谱鉴定的化合物具有可靠性. 为了实现代谢网络的可视化, 笔者根据KEGG库绘制了其相关的代谢网络图(图4(d)). 此外, 将上述15个生物标志物进行ROC分析(图4(e)), 其中亚油酸等10个生物标志物的区分度与灵敏度较高(AUC均大于0.9).

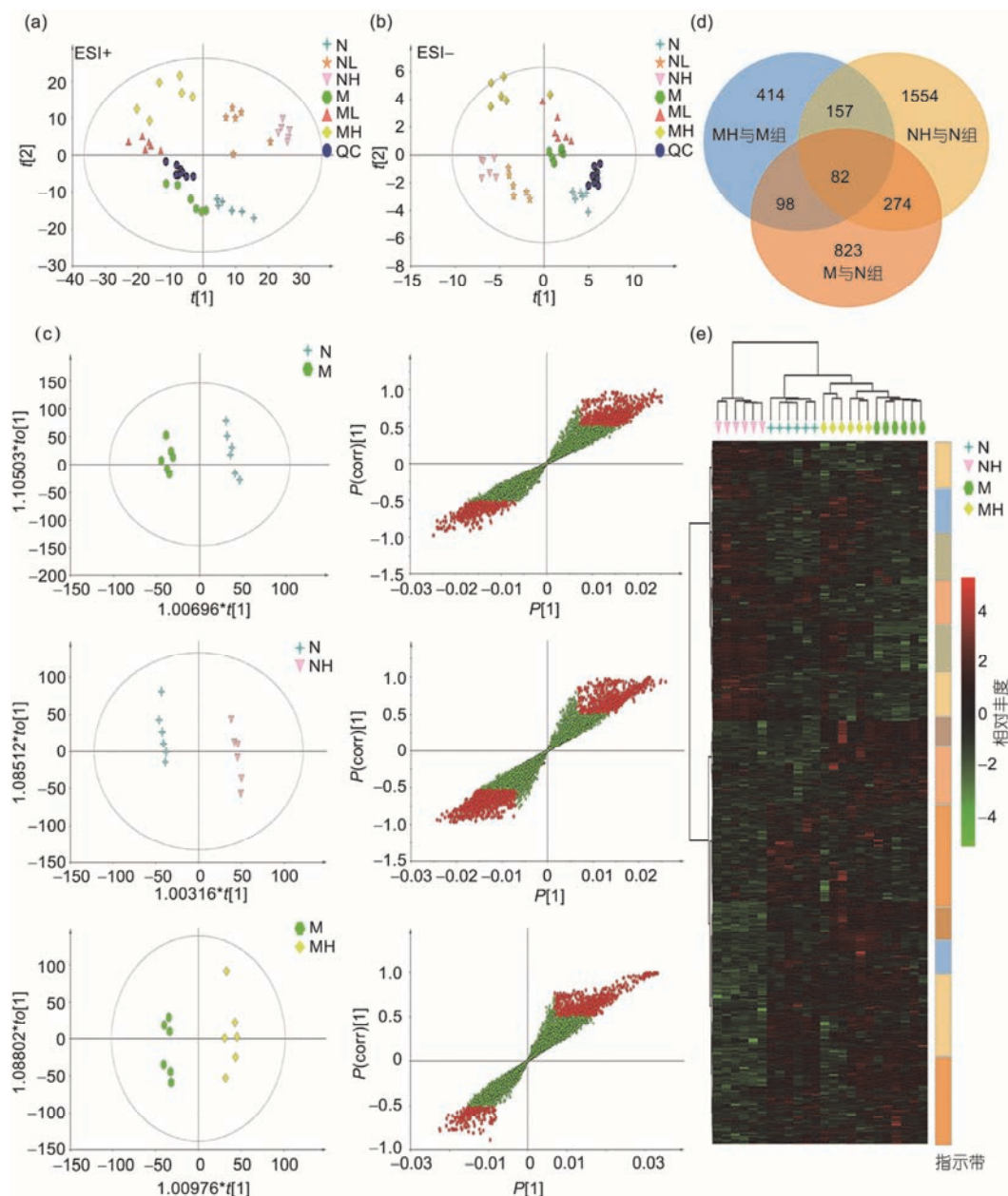


图3 润燥止痒胶囊相关肝损伤的代谢组学分析. 正离子模式(a)及负离子模式(b)下PCA图; (c) 正离子模式下N与M组、N与NH组、M与MH组的OPLS-DA图(左)和S-plot图(右); (d) N与M组、N与NH组、M与MH组间差异变量的韦恩图. 表示N与M组间的差异变量; 表示M与MH组间的差异变量; 表示NH与N组间的差异变量; 表示MH与M组、M与N组差异变量的交集; 表示NH与N组、M与N组差异变量的交集; 表示MH与M组、NH与N组差异变量的交集; 表示MH与M组、M与N组、NH与N组差异变量的交集; (e) 热图显示根据样品相似性进行无监督的层次聚类. 指示带的颜色与韦恩图中指示的差异变量的颜色相同

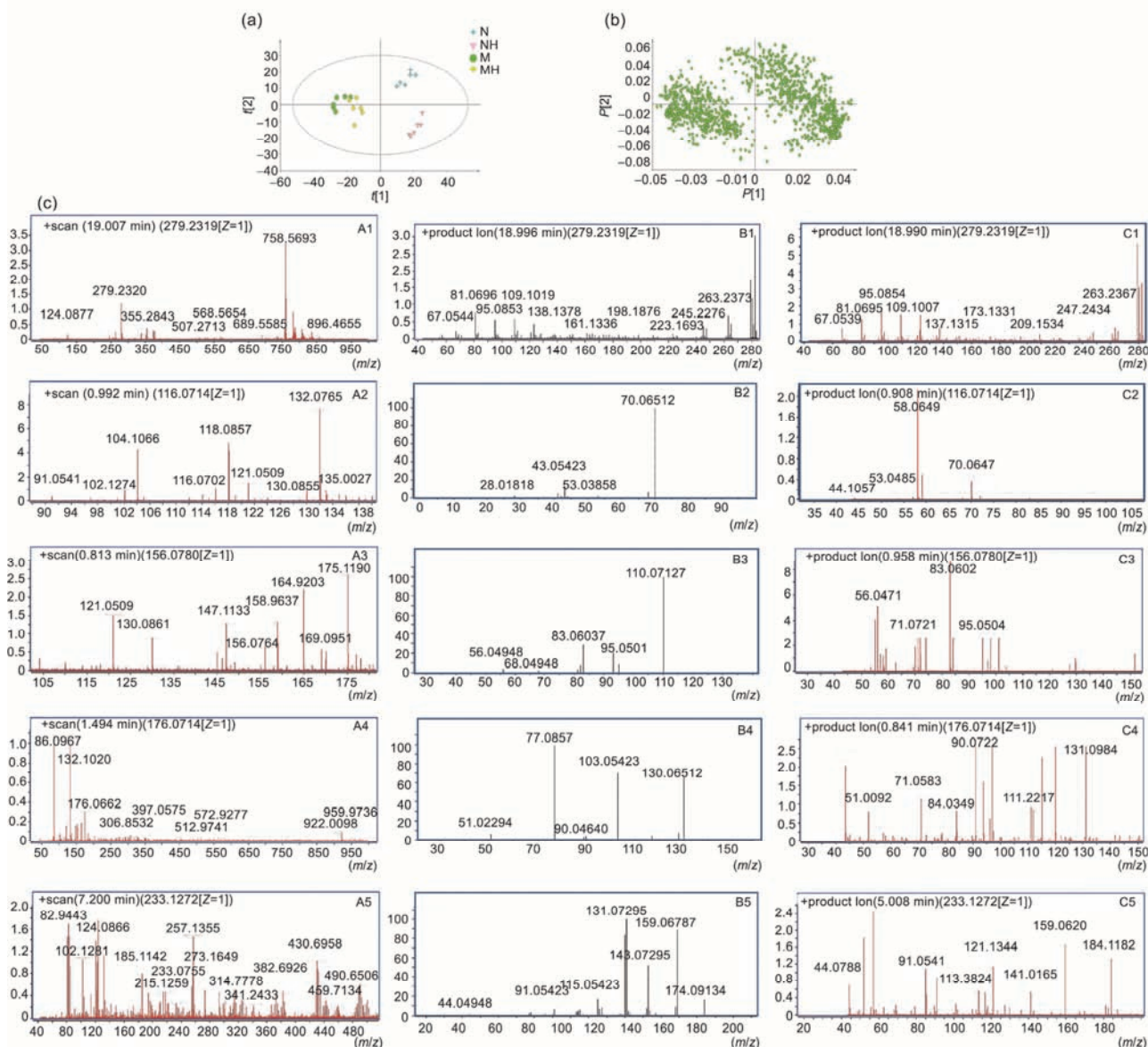
Figure 3 Metabolomic analysis of liver injury associated with Runzaozhiyang capsule. (a), (b) PCA score plots of different groups in ESI+ mode and ESI- mode; (c) OPLS-DA scores plot (left) and S-plots (right) of serum metabolic profiling using the data from significantly changed variables among N group vs M group; N group vs NH group; M group vs MH group in ESI+ mode. (d) Venn diagram illustrates numbers of common and uniquely significantly changed variables in plasma of N group vs M group, N group vs NH group, M group vs MH group. 表示 significantly changed variables from N and M group. 表示 significantly changed variables from M and MH group. 表示 significantly changed variables from N and NH group. 表示 the intersecting of significantly changed variables from N and M groups, M and MH groups. 表示 the intersecting of significantly changed variables from N and M groups, N and NH groups. 表示 the intersecting of significantly changed variables from N and NH groups, M and MH groups. 表示 the intersecting of significantly changed variables from N and M groups, M and MH groups, NH and N groups. (e) Heat map showing the unsupervised hierarchical clustering of samples according to the similarity of metabolome composition. The color of the indicator band is the same as that of the significantly changed variables indicated in the Venn diagram

将NH, N组间的差异变量与MH, M组的差异变量结合在一起, 通过韦恩图分析发现有512个MH, M组间的差异变量与NH, N组间的差异变量不重叠(图5(a)), 表明这些差异变量仅受LPS与药物协同作用的影响而不受药物或LPS的单独影响, 故可将其作为肝损伤相关变量. 将上述肝损伤相关变量通过PCA分析, MH组与其他3组完全区分开(图5(b)), 提示这些变量与肝损伤具有高度相关性. 最后将肝损伤相关变量通过上述类似的规则借助Mass Hunter PCDL Manager数据库及KEGG通路分析, 筛选得到8个生物标志物(表2), 其涉及亚油酸、花生四烯酸、甘油磷脂、

胆汁酸等代谢通路(图5(d)).

3 讨论

药物特异质肝损伤是临床重要的药物不良反应之一, 一旦发生可能引起急性肝衰竭甚至致死, 但由于其发生具有显著的个体差异和易感性现象, 目前还难以有效预测出易感个体, 风险防控困难, 因而是目前国内外药物研发失败、撤市和上市后安全警告的主要原因. 药物特异质肝损伤的易感机制研究是当前国内外毒理学研究的难点和前沿热点. 近年来研究表明, 传统“无毒”中药的肝损伤问题多与特异质



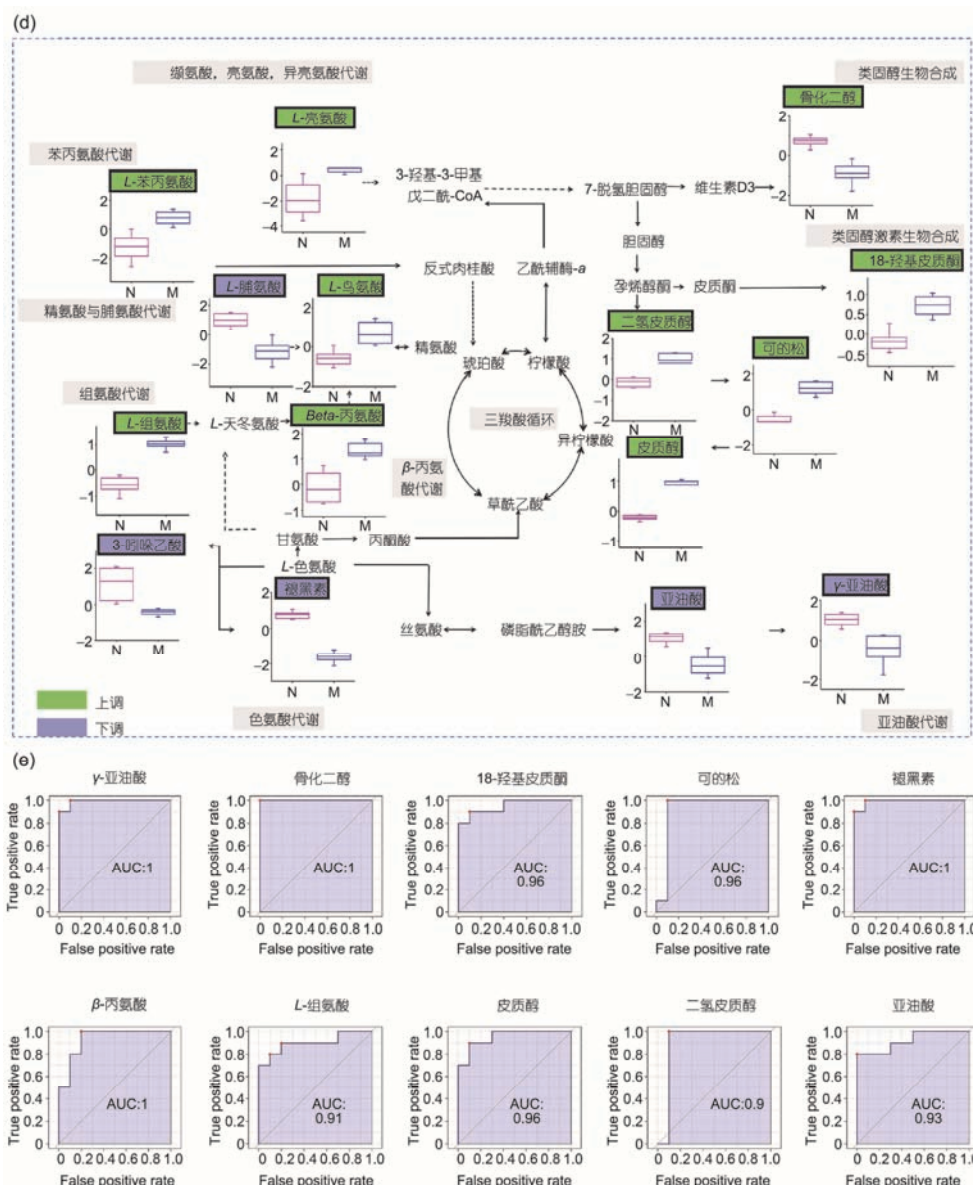


图 4 润燥止痒胶囊肝损伤易感性相关代谢物的分析。N组与M组间显著差异变量的PCA图(a)与载荷图(b)。 (c) 小鼠血浆中 γ -亚油酸、L-脯氨酸、L-组氨酸、3-吲哚乙酸、褪黑素(A1~A5)的一级质谱图, 5 种化合物对照品(B1~B5)及小鼠血浆中 5 种化合物的二级质谱图(C1~C5)。 (d) 肝损伤易感性相关潜在生物标志物的代谢网络图, 绿色与蓝色分别代表给予LPS后生物标志物含量上升与下降。 (e) 肝损伤易感性相关潜在生物标志物的ROC曲线图(AUC>0.9)

Figure 4 Analysis of related metabolites in liver injury susceptibility of Runzaozhiyang capsule. (a) PCA score plots and (b) loading score plots of serum metabolic profiling using the data from uniquely significantly changed variables among N and M groups. (c) the MS spectrum of γ -linolenic acid, L-proline, L-histidine, 3-indoleacetic acid and melatonin in mouse's serum (A1~A5), MS/MS spectrum of 5 standard components (B1~B5) and MS/MS spectrum of 5 components in mouse's serum (C1~C5). (d) metabolic network of potential metabolite markers associated with Hepatic injury susceptibility. Green and blue respectively represent the content of metabolites increase and decrease after lipopolysaccharide induced. (e) ROC curves of potential metabolite markers associated with Hepatic injury susceptibility (AUC>0.9)

肝损伤相关, 并且部分传统“无毒”中药(如何首乌、补骨脂、淫羊藿等)特异质肝损伤问题已逐渐被证实^[12], 免疫异常活化可能是何首乌特异质肝损伤的重要易感因素之一^[13]。润燥止痒胶囊作为典型的含何首乌

制剂(同时含有生何首乌和制何首乌), 其安全性受到了广泛关注。本研究通过临床病例分析显示, 润燥止痒胶囊致肝损伤是客观存在的, 其发生与剂量、疗程无明显的依赖关系(图1), 仅在极少数服药者出现肝

表1 润燥止痒胶囊肝损伤易感性相关潜在生物标志物的鉴定结果

Table 1 Results of identification of potential biomarkers for liver injury susceptibility in Runzaozhiyang capsule

序号	化学式	分子量 (ppm)	相差分子量 (ppm)	保留时间 (min)	代谢通路	代谢物	M/N	
							FC	P
1	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.0633	-4.5386	1.89	色氨酸代谢	3-吡啶乙酸	0.1184	8.60×10 ⁻³
2	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	232.1212	5.4043	3.79	色氨酸代谢	褪黑素	0.0206	7.30×10 ⁻⁵
3	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.0790	-2.0872	11.20	苯丙氨酸代谢	L-苯丙氨酸	5.1385	4.67×10 ⁻³
4	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132.0899	1.5258	8.51	精氨酸与脯氨酸代谢	L-鸟氨酸	2.3288	6.85×10 ⁻³
5	C ₃ H ₇ NO ₂	89.0477	0.0174	0.90	β-丙氨酸代谢	β-丙氨酸	2.5191	1.69×10 ⁻³
6	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.0946	0.8044	21.07	缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸生物合成	L-亮氨酸	2.1445	1.36×10 ⁻²
7	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400.3341	-1.2303	20.10	类固醇生物合成	骨化二醇	0.0365	2.05×10 ⁻²
8	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.2093	2.2099	8.33	类固醇激素生物合成	18-羟基皮质酮	2.9840	1.77×10 ⁻⁵
9	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.1937	0.6953	8.20	类固醇激素生物合成	可的松	6.9114	4.27×10 ⁻⁵
10	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.2144	-0.0420	7.65	类固醇激素生物合成	皮质醇	5.9442	6.30×10 ⁻⁵
11	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	364.2250	-1.5088	5.81	类固醇激素生物合成	二氢皮质醇	4.4665	2.70×10 ⁻³
12	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.2246	0.9217	20.37	亚油酸代谢	γ-亚油酸	0.3616	1.32×10 ⁻³
13	C ₅ H ₉ NO ₂	115.0633	1.7856	2.94	精氨酸与脯氨酸代谢	L-脯氨酸	0.4669	1.64×10 ⁻²
14	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.2402	0.3799	20.83	亚油酸代谢	亚油酸	0.3215	1.52×10 ⁻³
15	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.0695	-8.0386	0.93	组氨酸代谢	L-组氨酸	2.4641	3.31×10 ⁻³

损伤,具有典型的特异质肝损伤属性,且可能与免疫异常活化状态有关。基于前期构建的免疫应激介导的肝损伤易感动物模型,本研究考察了润燥止痒胶囊在正常状态和易感状态下引起肝损伤的差异性,结果发现:在正常小鼠上,灌胃低、高剂量(分别相当于临床等效剂量的2和6倍)润燥止痒胶囊对肝功能生化指标及肝组织病理学均无明显改变;在LPS复制的免疫应激易感模型动物上,造模因素并未引起肝损伤表型;而在免疫应激易感因素的基础上,润燥止痒胶囊高剂量组引起了小鼠肝功能生化指标(ALT, AST)显著升高($P<0.01$),肝组织病理可见大量炎性细胞浸润和炎症反应,出现了明显的肝损伤表型(图2)。上述结果提示,免疫应激是润燥止痒胶囊肝损伤的重要易感因素之一,尽管免疫应激易感因素并未引起实验动物肝损伤表型,但其可能已经改变了机体内在生物网络平衡,导致机体进入易感状态,因而导致药物特异质肝损伤的发生。那么,如何表征易感因素存在下机体的内在生物网络改变,对于理解药物特异质肝损伤的易感机制具有重要意义。

代谢和免疫是相互依赖、高度整合的两个系统,两者的平衡是维持机体正常状态的关键。最新研究表明,代谢重编程(metabolic reprogramming)是免疫

细胞发育、增殖和功能表型的重要基础,其可提供大量的能量与代谢中间物满足免疫细胞活化的生物合成需要^[14,15]。Buck等人^[16]也指出免疫细胞的功能在某种意义上实际是其代谢状态所决定的功能产物。此外,最近的研究结果表明,活化免疫细胞的代谢状态与非活化免疫细胞截然不同^[17],不同类型的免疫细胞具有不同的代谢通路活化或抑制特点^[18-21]。故可基于代谢组学,从代谢重编程的角度认识免疫学机制。基于这一认识,我们考虑免疫应激易感因素引起的机体生物网络紊乱,可通过代谢组学方法加以检测和表征(图6),并从代谢重编程的角度理解药物特异质肝损伤可能的易感机制。本文实验结果显示,尽管免疫应激易感因素并未引起M组小鼠肝损伤表型(图2),但从代谢组学可以看到与N组小鼠相比发生了明显改变(图3(a), (b)),共有1277个变量发生了显著性改变(图3(d)),在热图聚类分析中M与N组的实验个体可完全区分开(图3(e))。由此可见,从代谢组学的角度可以在比表型改变更敏感的代谢物分子水平表征药物特异质肝损伤易感因素对机体生物网络的影响。进一步将M与N组的差异化合物进行通路富集分析,可以看出组氨酸和丙氨酸等代谢通路显著上调($P<0.01$)、色氨酸等代谢通路显著下调($P<0.01$),

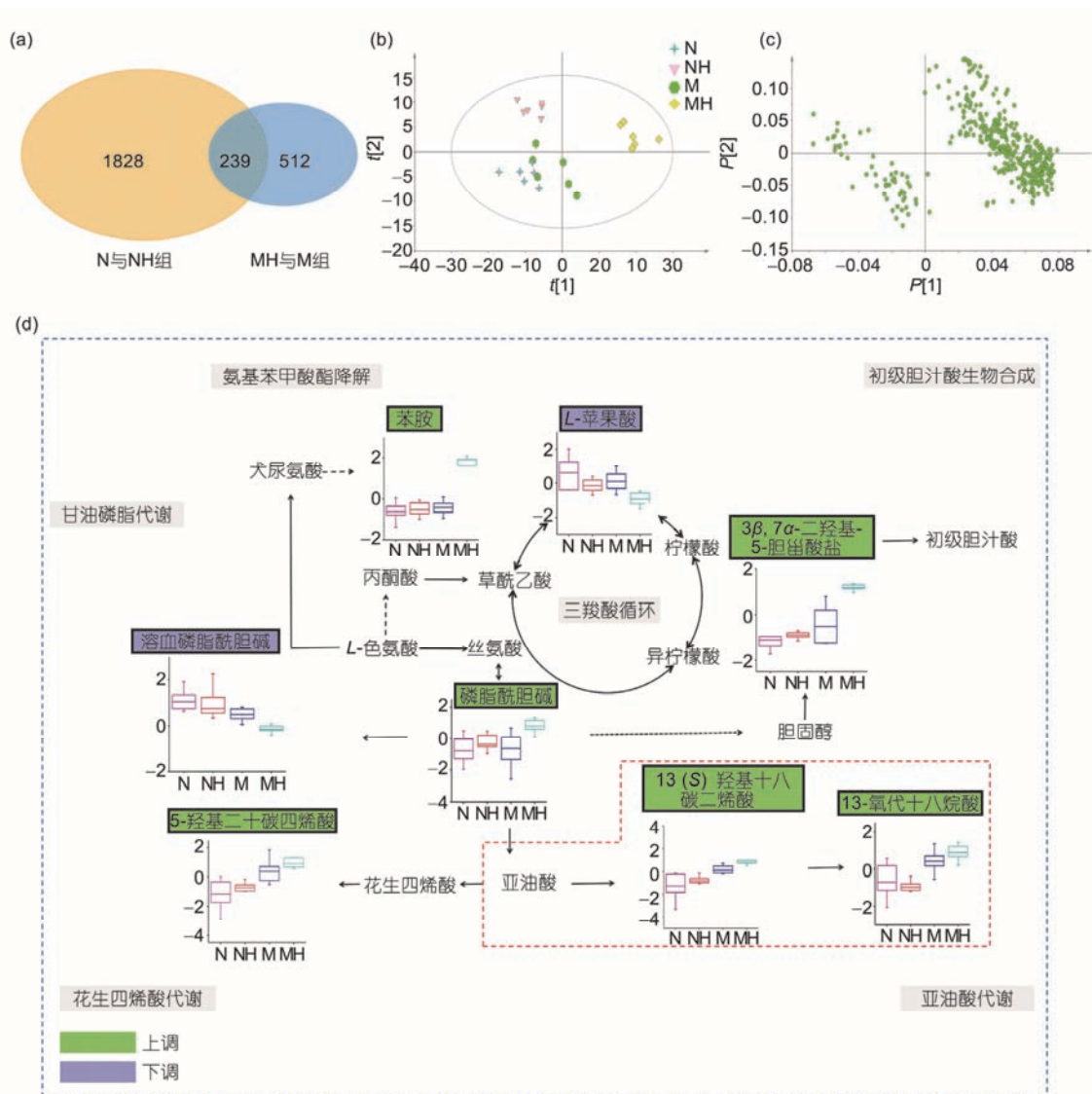


图 5 润燥止痒胶囊肝损伤相关代谢物的分析. (a) N与NH组, MH与M组间显著差异变量的韦恩图; 肝损伤相关变量的PCA图(b)与载荷图(c); (d) 肝损伤相关的潜在生物标志物的代谢网络图, 绿色与蓝色分别代表给予LPS及高剂量润燥止痒胶囊后生物标志物含量上升与下降, 肝损伤相关的生物标志物与肝损伤易感性相关的生物标志物共同的代谢通路在红色的虚框中

Figure 5 Analysis of liver injury related metabolites in Runzaozhiyang capsule. (a) Venn diagram displays numbers of common and uniquely significantly changed variables in plasma of N group vs NH group, M group vs MH group; PCA score plots (b) and loading score plots (c) of serum metabolic profiling using the data from variables associated with Hepatic injury (d) metabolic network of potential metabolites markers associated with Hepatic injury. Green and blue respectively represent the content of metabolites increase and decrease after using LPS combined with high dose Runzaozhiyang solution. The common metabolic pathways of metabolites related to Hepatic injury and Hepatic injury susceptibility is in the red frame

是易感模型动物组区别于正常组的主要代谢组学特征(图4(d)), 这一特殊的代谢重编程状态可能是介导药物特异质肝损伤易感因素的重要内在机制之一. 其中, 氨基酸代谢在机体免疫炎症反应过程中起着重要作用, 主要通过氨基酸代谢重分配用于合成参与炎症和免疫反应的蛋白质以及参与免疫细胞增殖和其他免疫反应^[22]. 在本实验中, M组血清中苯丙氨

酸、丙氨酸水平显著性升高, 有文献报道当机体受到炎症刺激或损伤后, 单核巨噬细胞分泌大量促炎细胞因子介导急性蛋白的合成和分泌, 从而引起急性期反应^[23]. 此外, 急性蛋白富含芳香族氨基酸(丙氨酸、苯丙氨酸), 并且炎症使血浆急性蛋白的浓度增加, 而相应蛋白质的氨基酸合成比例显著上升^[24]. 在本实验中, MH组血清中苯丙氨酸、丙氨酸含量显

表2 润燥止痒胶囊肝损伤相关潜在生物标志物的鉴定结果

Table 2 Results of identification of potential biomarkers for liver injury related to Runzaozhiyang capsule

序号	化学式	分子量 (ppm)	相差分子量 (ppm)	保留 时间 (min)	代谢通路	代谢物	M/N		MC/M	
							FC	P	FC	P
1	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.2351	5.6879	12.95	花生四烯酸代谢	5-羟基二十碳四烯酸	1.6837	0.6324	1.6479	0.0132
2	C ₄₄ H ₈₃ NO ₇ P	768.5907	2.9501	17.51	甘油磷脂代谢	磷脂酰胆碱	1.4035	0.4234	1.8691	0.0088
3	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2195	1.6024	13.52	亚油酸代谢	13-氧代十八烷酸	1.0529	0.9255	2.0026	0.0289
4	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312.2301	7.8034	13.66	亚油酸代谢	13(S)羟基十八碳二烯酸	1.1823	0.2354	1.5830	0.0489
5	C ₂₇ H ₄₄ O ₄	432.3240	-5.6984	24.67	初级胆汁酸生物合成	3β, 7α-二羟基-5-胆甾酸盐	1.3756	0.4608	2.1168	0.0389
6	C ₂₈ H ₅₇ NO ₇ P	550.3873	1.4834	13.72	甘油磷脂代谢	溶血磷脂酰胆碱	0.80691	0.2884	0.2088	0.0016
7	C ₆ H ₇ N	93.0578	-1.8757	9.96	氨基苯甲酸降解	苯胺	1.2040	0.2610	7.1461	0.0124
8	C ₄ H ₆ O ₅	134.0215	1.0935	1.13	三羧酸循环	L-苹果酸	0.91323	0.9676	0.4681	0.0050

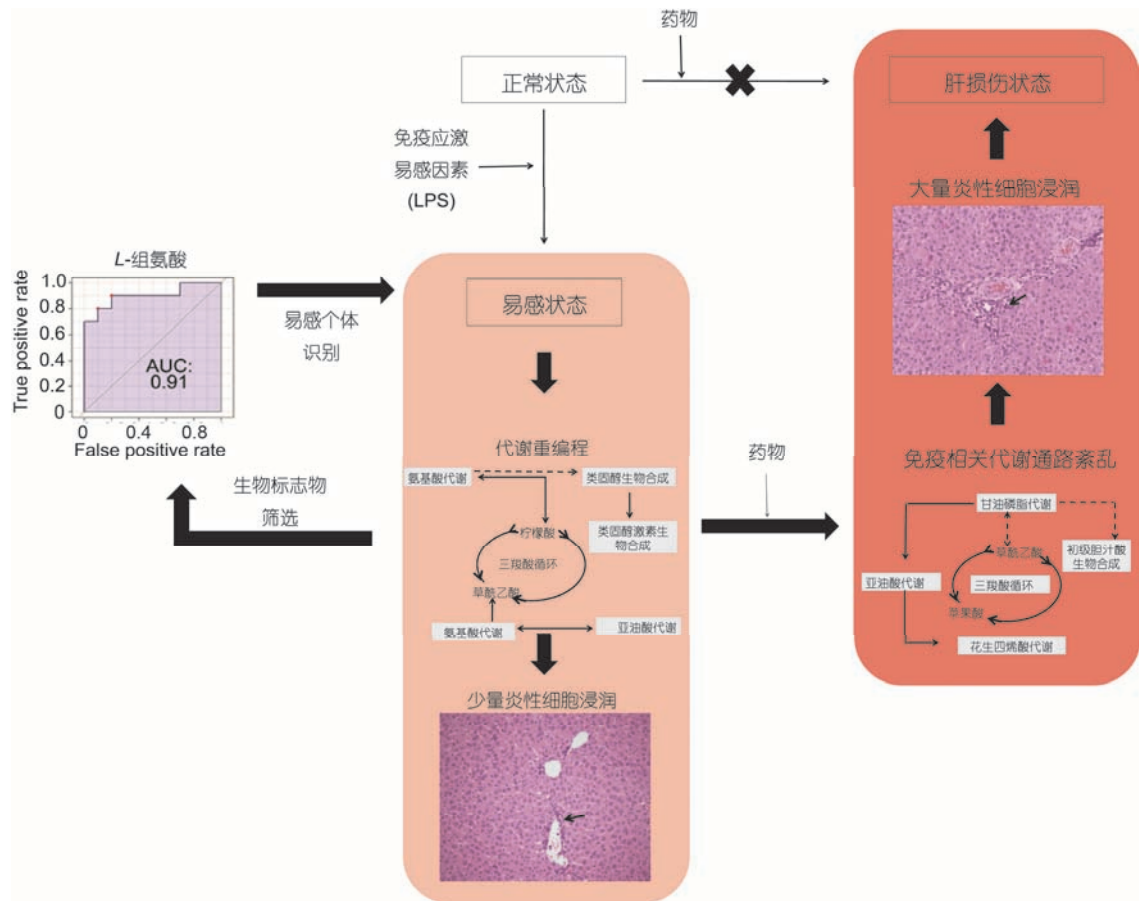


图6 基于代谢组学的机体代谢状态与润燥止痒胶囊肝损伤易感性及其导致肝损伤的关系

Figure 6 The relationship among the metabolic state and the susceptibility to liver injury and liver injury induced by Runzaozhiyang capsule was studied by metabolomics

著升高可能与炎症应激状态急性蛋白大量合成相关。组氨酸浓度升高引起组氨酸代谢紊乱亦是免疫应激相关作用的原因之一。组氨酸为组胺的前体化合物，后者可增强多种免疫细胞分泌IL-1 α ，IL-1 β 等促炎细

胞因子及趋化因子,从而促进炎症反应^[25]。褪黑素、3-吡啶乙酸含量下降引起色氨酸代谢紊乱也是促进机体炎症的原因之一,如研究表明褪黑素能抑制免疫细胞释放TNF- α 等促炎因子,其浓度与炎症程度呈负相关,色氨酸代谢物通过褪黑素生物合成途径生成自由基清除剂,防止炎症产生的自由基攻击细胞与组织^[26]。综合来看,在免疫应激易感因素作用下,引起机体代谢重编程,尽管未引起肝脏明显的炎症反应和肝损伤表型,但代谢状态的改变使机体免疫功能倾向于向促炎性的方向发展,使机体对药物肝损伤作用更为敏感,反映出易感因素与药物的协同致肝损伤作用。

与上述认识相一致的是,在免疫应激易感因素的基础上,润燥止痒胶囊确实可引起易感模型小鼠的显著肝损伤表型,表现为血清肝功能生化指标显著升高,以及肝脏组织大量炎性免疫细胞浸润和炎症反应(图2)。进一步分析发生肝损伤表型后的代谢组学特征发现,与M组相比,MH组此时的代谢谱发生了显著改变(图3(a), (b)),共有751个变量发生了显著性改变(图3(d)),在热图聚类分析中,MH与M组的实验个体可完全区分开(图3(e))。由此可见,从代谢组学的角度,可表征出药物在易感因素的基础上引起肝损伤表型的生物网络改变。值得注意的是,在肝损伤表型下的代谢组改变,与易感因素本身引起的代谢组改变是不同的。为此,我们进一步从LPS处理基础上的MH与M组的差异变量中,扣除了NH与N组间的差异变量(即排除LPS或药物本身单独对机体的影响),得到512个由易感因素与药物协同作用下(肝损伤表型)影响的肝损伤相关的变量。进一步通过代谢物鉴定和通路富集分析,可以看出润燥止痒胶囊引起肝损伤改变的代谢组特征主要表现为:三羧酸循环、花生四烯酸、亚油酸、甘油磷脂、胆汁酸、氨基苯甲酸等代谢通路的改变(图5(d),表2)。研究报道三羧酸循环代谢减弱、糖酵解代谢增强是巨噬细胞受到刺激(包括药物损伤)后极化为促炎的M1表型时的主要代谢重编程特征^[27];肝脏巨噬细胞(枯否细胞)的极化在药物肝损伤过程中扮演重要角色,在急性期表现为M1型巨噬细胞为主导的免疫应答过程^[28],与本研究代谢组检测发现的代谢组特征相一致。L-苹果酸为三羧酸循环代谢通路中的中间代谢产物,本实验中,与N组相比,M组血清中L-苹果酸浓度轻微降低特别在在MH组血清中的含量水平显著下降,提

示润燥止痒胶囊导致肝损伤与三羧酸循环代谢状态改变,调控免疫细胞的分型和功能有关。花生四烯酸代谢在肝脏炎症损伤过程中也起着重要作用。当细胞受到炎症刺激时,花生四烯酸则被氧化产生5-羟基二十碳四烯酸,后者在脂氧化酶的作用下生成5-氧代二十碳四烯酸等促炎介质,进一步扩大炎症反应加重肝损伤^[29]。此外,亚油酸代谢是肝损伤易感相关及肝损伤相关标志物共同影响的代谢通路,其代谢过程主要与氧化应激及炎症相关。文献研究提示,当机体受到轻微炎症刺激时,亚油酸则从磷脂中释放出来并进一步生成炎症介质^[30]。本实验中,与N组相比,M组血清中亚油酸浓度显著降低,提示免疫应激状态可能与亚油酸消耗生成促炎介质相关。13(S)羟基十八碳二烯酸、13-氧代十八烷酸为亚油酸的主要氧化产物,也是重要的促炎介质^[31,32]。本实验中,与N组相比,M组中两者浓度轻微升高,MH组浓度显著升高,提示磷脂、亚油酸氧化加剧,生成大量促炎介质诱发肝损伤;而在其他肝脏炎症损伤的过程中13(S)羟基十八碳二烯酸、13-氧代十八烷酸的浓度显著升高^[33],亦与本实验结果一致。

综上所述,本实验从临床病例和免疫应激动物模型初步证实了润燥止痒胶囊肝损伤的客观真实性及特异质属性;在免疫应激易感因素作用下,尽管未引起肝脏明显的炎症反应和肝损伤表型,但代谢状态的改变使机体免疫功能倾向于向促炎性的方向发展,使机体对药物肝损伤作用更为敏感,反映出代谢重编程可能是药物特异质肝损伤易感性的重要机制之一;在易感因素的协同下,药物引起肝损伤作用并引起代谢通路的进一步紊乱,其代谢组表现为促进免疫细胞向炎性功能转化的代谢特征,参与或支持了药物肝脏损伤过程中的组织急性炎症反应(图6)。由此可见,从代谢组学的角度,可在比表型改变更敏感的代谢物分子水平,表征药物特异质肝损伤易感因素对机体生物网络的影响。为此,我们基于易感因素相关的代谢紊乱通路,筛选发现了亚油酸、骨化二醇、18-羟基皮质酮等10个生物标志物可较好地识别易感模型动物(ROC分析中AUC均大于0.9)(图4(e)),提示其具有较好的临床诊断价值,可为肝损伤易感个体的识别提供参考。本研究从代谢组学和代谢重编程的角度,为理解药物特异质肝损伤的易感机制和指导临床合理用药提供了新视角。

参考文献

- 1 Zhu Y, Liu S H, Wang J B, et al. Clinical analysis of drug-induced liver injury caused by *Polygonum multiflorum* and its preparations (in Chinese). *Chin J Integr Tradl Western Med*, 2015, 35: 1442–1447 [朱云, 刘树红, 王伽伯, 等. 何首乌及其制剂导致药物性肝损伤的临床分析. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35: 1442–1447]
- 2 Pang J Y, Bai Z F, Niu M, et al. The toxic and protective effects of *Polygonum multiflorum* on normal and liver injured rats based on the symptom-based prescription theory. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50: 973–979
- 3 SiTu X X, Zhang H. Study on curative effect of desloratadine combined with runzaozhiyang capsule on senile skin pruritus (in Chinese). *China Med Pharm*, 2018, 8: 95–97 [司徒欣欣, 张红. 地氯雷他定联合润燥止痒胶囊对老年皮肤瘙痒症的疗效研究. *中国医药科学*, 2018, 8: 95–97]
- 4 Wang D C, Zhou R. A case of liver injury caused by Runzaozhiyang capsule was reported repeatedly and the literature was reviewed (in Chinese). *Chin J Clin Ratl Drug Use*, 2018, 4: 19 [王冬初, 周荣. 润燥止痒胶囊反复导致肝损伤1例并文献复习. *临床合理用药杂志*, 2018, 4: 19]
- 5 Tian L L, Zhou T R, Wu J, et al. A case of liver injury induced by oral Runzaozhiyang capsule (in Chinese). *Shanghai Med Pharm J*, 2017, 38: 35–37 [田璐璐, 周陶然, 吴涓, 等. 润燥止痒胶囊致药物性肝损1例. *上海医药*, 2017, 38: 35–37]
- 6 Lin F, Li K. Acute liver failure induced by Runzaozhiyang capsules (in Chinese). *Adverse Drug React J*, 2014, 5: 319–320 [林芳, 李克. 润燥止痒胶囊致急性肝衰竭. *药物不良反应杂志*, 2014, 5: 319–320]
- 7 Zhu Y, Niu M, Chen J, et al. Hepatobiliary and pancreatic: Comparison between Chinese herbal medicine and Western medicine-induced liver injury of 1985 patients. *J Gastroen Hepatol*, 2016, 31: 1476–1482
- 8 Li C Y, Li X F, Tu C, et al. The idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* based on endotoxin model (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2015, 50: 28–33 [李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的首乌特异质肝损伤评价. *药学报*, 2015, 50: 28–33]
- 9 Li C, Niu M, Bai Z, et al. Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb, *Polygonum multiflorum*. *Front Med*, 2017, 11: 1–13
- 10 Bai Z F, Yuan G, Zuo X B, et al. Progress in research on the pathogenesis of immune regulation and idiosyncratic drug-induced liver injury (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2017, 52: 1019–1027 [柏兆方, 高源, 左晓彬, 等. 免疫调控与特异质型药物性肝损伤发生机制研究进展. *药学报*, 2017, 52: 1019–1027]
- 11 Tang J F, Wang X Y, Wen Q, et al. Idiosyncratic hepatotoxicity evaluation of Zhuangguguanjie wan mediated by immune stress (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2017, 52: 1033–1040 [唐进法, 王晓艳, 温强, 等. 免疫应激介导的壮骨关节丸致特异质肝损伤评价. *药学报*, 2017, 52: 1033–1040]
- 12 Wang J B, Chui H R, Bai Z F, et al. Precision medicine-oriented safety assessment strategy for traditional Chinese medicines: Disease-syndrome-based toxicology (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2016, 51: 1681–1688 [王伽伯, 崔鹤蓉, 柏兆方, 等. 精准医学下的中药安全性评价策略和方法: 病证毒理学. *药学报*, 2016, 51: 1681–1688]
- 13 Li C Y, He Q, Gao D, et al. Idiosyncratic drug-induced liver injury linked to *Polygonum multiflorum*: A case study by pharmacognosy. *Chin J Integr Med*, 2017, 23: 625–630
- 14 Próchnicki T, Latz E. Inflammasomes on the crossroads of innate immune recognition and metabolic control. *Cell Metab*, 2017, 26: 71–93
- 15 Kishton R J, Sukumar M, Restifo N P. Metabolic regulation of T cell longevity and function in tumor immunotherapy. *Cell Metab*, 2017, 26: 94–109
- 16 Buck M D, Sowell R T, Kaech S M, et al. Metabolic instruction of immunity. *Cell*, 2017, 169: 570–586
- 17 Ghesquière B, Wong B W, Kuchnio A, et al. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature*, 2014, 511: 167–176
- 18 Murray P J, Rathmell J, Pearce E. SnapShot: Immunometabolism. *Cell Metab*, 2015, 22: 190
- 19 Wang K, Wang F, Yu H X. Metabolic reprogramming of immune cells and its effects on immune function (in Chinese). *Current Immunol*, 2017, 37: 146–151 [王可, 王芳, 余红秀. 免疫细胞的代谢重编程及其对免疫功能的影响. *现代免疫学*, 2017, 37: 146–151]
- 20 Jha A K, Huang S C, Sergushichev A, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 2015, 42: 419–430
- 21 Pearce E L, Pearce E J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 2013, 38: 633–643
- 22 Jin M Y, Liu B J, Sun J Y, et al. Amino acid metabolism and immune response (in Chinese). *Chin J Anim Sci*, 2007, 43: 37–39 [井明艳, 刘波静, 孙建义, 等. 氨基酸代谢与免疫反应. *中国畜牧杂志*, 2007, 43: 37–39]
- 23 Vandevyver S, Dejager L, Vandenbroucke R E, et al. An acute phase protein ready to go therapeutic for sepsis. *EMBO Mol Med*, 2014, 6: 2–3

- 24 Reeds P J, Fjeld C R, Jahoor F. Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? *J Nutr*, 1994, 124: 906–908
- 25 Yamaki K, Thorlacius H, Xie X L, et al. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Brit J Pharmacol*, 2010, 123: 390–399
- 26 Wang H, Sheng Y X, Wei W, et al. Effects of melatonin on free radical and cytokine of immunological liver injury mice (in Chinese). *Chin Pharmacol Bull*, 2002, 18: 331–333 [王华, 沈玉先, 魏伟, 等. 褪黑素对免疫性肝损伤小鼠自由基和细胞因子的影响. *中国药理学通报*, 2002, 18: 331–333]
- 27 Wada J. Reprogramming of metabolism in immune-mediated cells. *Diabetol Inter*, 2017, 8: 1–4
- 28 Uetrecht J. Immunoallergic drug-induced liver injury in humans. *Semin Liver Dis*, 2009, 29: 383–392
- 29 Grant G E, Rokach J, Powell W S. 5-Oxo-ETE and the OXE receptor. *Prostag Oth Lipid M*, 2009, 89: 98–104
- 30 Khazen W, M'Bika J P, Collinet M, et al. Differentiation-dependent expression of interferon gamma and toll-like receptor 9 in 3T3-F442A adipocytes. *Biochimie*, 2007, 89: 669–675
- 31 Ramsden C E, Ringel A, Feldstein A E, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostag Leukotr Ess*, 2012, 87: 135
- 32 Zein C O, Lopez R, Fu X, et al. Pentoxifylline decreases oxidized lipid products in nonalcoholic steatohepatitis: New evidence on the potential therapeutic mechanism. *Hepatology*, 2012, 56: 1291
- 33 Feldstein A E, Lopez R, Tamimi T A, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res*, 2010, 51: 3046–3054

Summary for “中药特异质肝损伤易感因素的代谢组学研究: 以何首乌制剂为例”

Metabolomic study on the susceptible factors of idiosyncratic Traditional Chinese Medicine-induced liver injury: Exemplification of a *Polygonum multiflorum* preparation

Yuanyuan Zhou^{1,2†}, Ming Niu^{1†}, Can Tu^{1,2}, Luge Wei², Feilin Ge², Le Zhang^{1,2}, Xiaohui Wang², Chunyu Li², Xiaoyi Liu², Yaming Zhang², Yi Tang^{1*}, Xiaohe Xiao² & Jiabo Wang^{2*}

¹ School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

² China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;

³ Cancer Hospital of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: wjb0128@126.com; tangyi0127@126.com

The underlying mechanism(s) that govern idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI) have remained poorly defined. Several studies have shown that IDILI was caused by body diathesis, environment, metabolism, immunization, etc. However, the underlying mechanism(s) of IDILI was still ambiguous, which led to an unsolved issue in clinical toxicology. Understanding of such mechanisms is critical not only for the prevention of such DILI adverse effect as well as the clinical diagnosis, intervention or management of the affected individuals. In this study, we carried out a metabolomic study on mice treated with Runzao Zhiyang Capsule (RZZY), since *Polygonum multiflorum*, a key ingredient in this preparation, is known to cause DILI. Clinical case analysis showed that a small number of patients developed drug-induced liver injury (DILI) in a dose-independent manner. Meanwhile, the affected individuals often exhibited skin conditions associated with features of abnormal inflammatory responses. In normal mice, treatment with RZZY alone had no significant effects on biochemical indices of liver function, including aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities. At the same time, it had no significant effects on liver histopathology either. Moreover, we used non-toxic dose of lipopolysaccharide (LPS) pretreatment to produce mild inflammatory stress mice model, which showed no significant liver injury phenotype, except for a small number of inflammatory immune cells infiltration in portal areas of liver. However, by metabolomics profiling, we found significant alterations of plasma metabolites in the LPS treated mice, including up-regulated histidine and alanine metabolic pathways ($P < 0.01$) and significantly down-regulated tryptophan metabolic pathways ($P < 0.01$), etc. These results suggested that metabolic reprogramming might be an important underlying mechanism for susceptibility of liver injury. On the other side, the mice co-treated with RZZY and LPS induced significant liver injury phenotype, accompanying with a large number of inflammatory immune cells infiltration in portal areas of liver. Meanwhile, there were significant changes in several pathways related to inflammation by serum metabolome analysis, including the arachidonic, linoleic acid, glycerophospholipid, bile acid metabolic pathways, etc. The results above comprehensively suggested that metabolic reprogramming may play an important role in susceptibility mechanism of IDILI. Furthermore, based on those disordered metabolic pathways related to the susceptible factors, a receiver operating characteristic (ROC) curves analysis was used for identifying biomarkers effected by susceptible factors. Eventually, 10 biomarkers were found to be able to identify susceptible model mice from normal ones (ROC AUC all greater than 0.9), involving linoleic acid, calcifediol, *beta*-alanine, *l*-histidine, cortexolone, cortisone, dihydrocortisol, melatonin and 18-hydroxycorticosterone, which may provide potential application value for recognition of susceptible individuals in clinical.

idiosyncratic drug-induced liver injury, *Polygonum multiflorum*, susceptible factors of idiosyncratic drug-induced liver injury, immunological stress, metabolomics, metabolic reprogramming

doi: 10.1360/N972018-00995