

· 药物代谢 ·

雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析

常立娟, 李佐静, 李清, 隋振宇, 李晓, 毕开顺*
(沈阳药科大学药学院, 医疗器械学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:联合超高效液相色谱与复合型三重四级杆/线性离子阱串联质谱联用技术(UFLC-MS/MS)及统计学分析方法研究雷公藤对大鼠血清中内源性小分子化合物的影响和肾毒性作用机制,寻找与肾毒性相关的生物标记物和代谢通路。方法:利用试剂盒法测定给药 14 d 后大鼠血清生化指标,观察肾组织切片。血清样本采用乙腈沉淀蛋白法,UFLC-MS/MS 分析测定,正离子一级全扫描模式,经主成分分析法和主成分判别分析法处理数据。结果:与空白组大鼠相比,雷公藤乙醇提取物组大鼠血清生化指标(血清肌酐、尿素氮)显著升高;组织病理学切片明显病变,表明造模成功。血清中二甲基甘氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、溶血卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和甘油二酯等 9 种代谢物有显著性差异,鉴定为雷公藤致肾毒性的生物标记物。结论:雷公藤对肾脏的毒性作用机制可能与氨基酸代谢、磷脂代谢等有关,为雷公藤类药物临床毒性的早期预防提供参考。

[关键词] 雷公藤; 代谢组学; 肾毒性; 主成分分析法; 二甲基甘氨酸; 苯丙氨酸; 溶血卵磷脂

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0089-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240089

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160928.1625.024.html>

[网络出版时间] 2016-09-28 16:25

Metabonomic Analysis on Serum in Nephrotoxic Rats Induced by Radix et Rhizoma Tripterygii

CHANG Li-juan, LI Zuo-jing, LI Qing, SUI Zhen-yu, LI Xiao, BI Kai-shun*
(School of Medical Devices, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** An ultrafast liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry (UFLC-MS/MS) combined with statistical analysis method was used to investigate the changes of endogenous small molecule compounds and nephrotoxic mechanism in the rat serum induced by Radix et Rhizoma Tripterygii and to explore biomarkers associated with renal toxicity as well as metabolism pathways. **Method:** After intragastric administration for 14 days, serum biochemical indexes was detected by kit method and nephridial tissue section was observed. The serum samples were added acetonitrile for protein precipitation and analyzed by UFLC-MS/MS with full scan mode under positive ion scan mode, then principle component analysis (PCA) and principle component analysis discriminant analysis (PCA-DA) were used for data processing. **Result:** Compared with the blank group, serum biochemical indexes [creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN)] of Radix et Rhizoma Tripterygii ethanol extract group increased significantly and histopathological section damaged obviously which showed that the animal module prepared well. Nine significant different metabolites, such as dimethylglycine,

[收稿日期] 20160323(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(41310164);辽宁省百千万人才工程(41320834);辽宁省高校优秀人才支持计划项目(51120915)

[第一作者] 常立娟,在读硕士,从事代谢组学及其数据分析方法研究,Tel:024-23986296,E-mail:372889562@qq.com

[通讯作者] *毕开顺,博士,教授,博士生导师,从事代谢组学、中药药物信息学和药代动力学研究,Tel:024-23986259,E-mail:kaishunbi.syphu@gmail.com

lysine, phenylalanine, lysolecithin, phosphatidyl choline, phosphatidylserine and diglyceride, were identified as biomarkers of nephrotoxicity induced by Radix et Rhizoma Tripterygii. **Conclusion:** Nephrotoxic mechanism induced by Radix et Rhizoma Tripterygii may be related to the metabolism of amino acid and phospholipids, and it provides reference relating to the early clinical toxicity prevention of Radix et Rhizoma Tripterygii.

[**Key words**] Radix et Rhizoma Tripterygii; metabonomics; nephrotoxicity; principle component analysis; dimethylglycine; phenylalanine; lysolecithin

代谢组学是关于生物体系内源代谢物质种类、数量及变化规律的科学,是结合实验与信息计算处理的新型药物毒性评价技术,能进一步阐明毒性机制、毒性进程和毒性物质基础^[1-2]。运用代谢组学分析技术研究中药,对认识其药效作用和产生毒副作用的物质基础,以及在治疗疾病过程中正确地使用中药,具有非常重要的科学意义和经济价值。

雷公藤在我国药用历史悠久,具有免疫抑制、抗炎、抗肿瘤等作用,用于治疗类风湿关节炎等自身免疫性疾病,临床应用广泛,但由于雷公藤治疗量与中毒量相近,不良反应时有发生,主要表现在生殖系统、泌尿系统、消化系统、免疫系统及心血管系统等方面^[3-5]。近年来,雷公藤致肝毒性代谢组学的报道逐渐增多^[6],尤其是以雷公藤单体成分雷公藤甲素导致的肝损伤为主^[7],而其肾毒性报道较少,作用机制也不甚明确。本实验从雷公藤的整体作用角度出发,采用代谢组学分析技术对其致大鼠肾毒性血清中小分子化合物的影响和作用机制进行研究,预测雷公藤致肾毒性的潜在生物标记物及代谢通路,为雷公藤类药物临床毒性的早期预防提供参考。

1 材料

LC-20AD 型超高速液相色谱仪(日本岛津公司),QTRAP™ 4000 型质谱仪(美国 AB Sciex 公司),AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),VFD-2000 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),TGL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Varioskan Flash 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

雷公藤药材购自沈阳天益堂药房连锁有限公司,关木通药材购自安国药材市场,均经沈阳药科大学中药学院贾英教授鉴定,分别为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 的干燥根,马兜铃科植物东北马兜铃 *Aristolochia manshuriensis* 的干燥木质藤茎;肌酐、尿素氮试剂盒(南京建成生物工程研究所),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康雄性 Wistar 大鼠,6~8 周龄,体重 220~250 g,由沈阳药科大学实验动物中心提供,合格证

号 SCXK(辽)2015-0001。

2 方法与结果

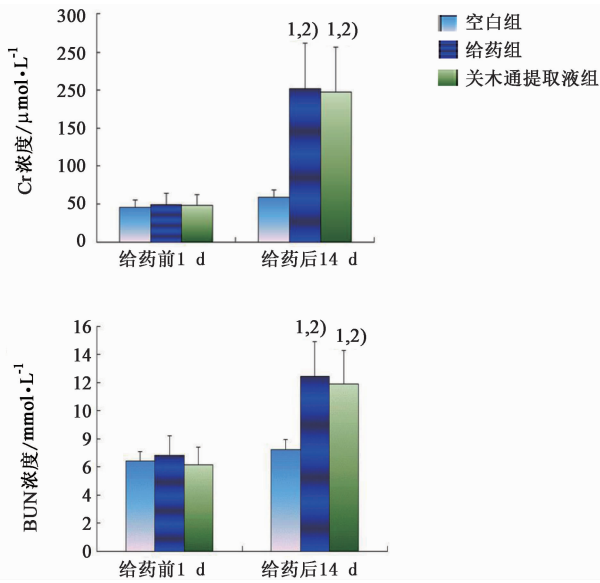
2.1 雷公藤提取液的制备 取雷公藤药材约 1.2 kg,粉碎成粗粉,加 10 倍量 95% 乙醇浸泡 0.5 h,回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,蒸干溶剂,冷冻干燥后制成冻干粉,于干燥器中密封保存备用。加水配成 3.0 g·mL⁻¹ 雷公藤提取液(以生药量计,下同),现用现配。

2.2 关木通提取液的制备 取关木通约 600 g,粉碎成粗粉,加 10 倍量水浸泡 0.5 h,加热至沸腾,煎煮 2 h,反复煎煮 2 次,合并滤液,浓缩,冷冻干燥后制成冻干粉,于干燥器中密封保存备用。加水配成 1.5 g·mL⁻¹ 关木通提取液,作为阳性药液,现用现配。

2.3 动物分组与给药 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组(水),给药组(雷公藤提取液 30 g·kg⁻¹·d⁻¹)和阳性组(关木通提取液 15 g·kg⁻¹·d⁻¹),动物房内保持 12 h 光照,12 h 避光循环饲养,室内温度(23±1)℃,相对湿度 45%~60%,给予标准饲料和饮用水,适应 7 d 后每天灌胃 1 次,连续灌胃 14 d,给药期间大鼠自由进食,饮水。

2.4 样品采集与预处理 于给药前 1 d 和给药后 14 d,眼眶静脉丛采血约 1 mL,静置 >30 min,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清样品保存于 -80℃ 冰箱中。进样前取大鼠血清 200 μL,加入乙腈 400 μL,涡旋混合,离心(13 000 r·min⁻¹,5 min,下同),吸取上清液,氮气吹干,残渣加乙腈-水(10:90)200 μL 复溶,离心后取上清液进样分析。

2.5 肾功能测定 于给药前和最后 1 d 给药后,采集大鼠血液 0.5 mL,静置 >30 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层血清,利用肌氨酸氧化酶法测定血清肌酐(Cr)浓度,脲酶法测定尿素氮(BUN)浓度。采用独立样本 *t* 检验法对不同组大鼠的 Cr 和 BUN 浓度进行统计学分析,见图 1。连续灌胃给药 14 d 后,雷公藤提取液组和关木通提取液组大鼠的 Cr 和 BUN 水平与空白组相比均具有显著性差异。关木通作为阳性药用以检测实验系统的有效性,表明本实验系统可靠。

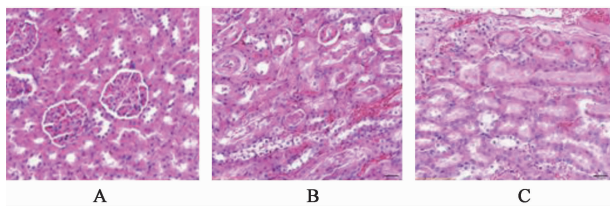


与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与给药前比较²⁾ $P < 0.05$

图 1 大鼠血清中肌酐和尿素氮水平检测 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Detection of creatinine and blood urea nitrogen in rat serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.6 组织病理学观察 于最后 1 d 给药及采血结束后,处死大鼠,取新鲜肾组织并置于 10% 中性福尔马林溶液中 24 h,经乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,置光学显微镜下观察,见图 2。结果发现灌胃给药 14 d 后,空白组大鼠肾细胞呈现正常结构;给药组和关木通提取液组大鼠肾脏表现为肾小球萎缩呈分叶状、坏死,局部肾小管呈液化性坏死,证明造模成功。



A. 空白组; B. 给药组; C. 关木通提取液组

图 2 大鼠肾组织病理学切片 ($\times 100$)

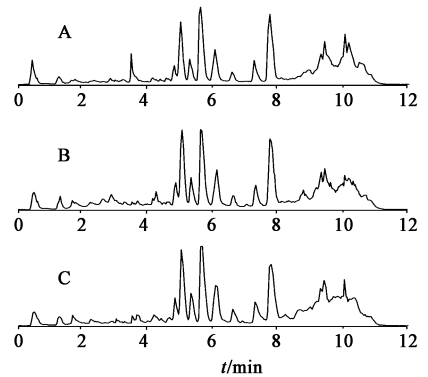
Fig. 2 Histopathological photomicrographs of rat kidney sections ($\times 100$)

2.7 UFLC-MS/MS 样品分析

2.7.1 色谱条件 Shim-pack XR-ODS 色谱柱 (2.0 mm \times 75 mm, 2.2 μ m), 流动相 0.05% 甲酸水溶液 (A)-0.05% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 0.5 min, 10% ~ 30% B; 0.5 ~ 2.5 min, 30% ~ 60% B; 2.5 ~ 6.5 min, 60% ~ 70% B; 6.5 ~ 8.0 min, 70% ~ 90% B; 8.0 ~ 9.5 min, 90% ~ 95% B; 9.5 ~ 10 min, 95% ~ 10% B), 流速 0.36 mL \cdot min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L。

2.7.2 质谱条件 电喷雾离子源, 正离子模式检测, 离子源温度 500 $^{\circ}$ C, 离子喷雾电压 4.5 kV, 氮气作为雾化气 1, 雾化气 2 与气帘气, 压力分别为 34.5, 34.5, 20.7 MPa, 扫描方式为全扫描一级质谱 (m/z 100 ~ 900) 与增强型离子扫描。

大鼠血清全扫描总离子流 (TIC) 色谱图见图 3, 随机选取 7 个色谱峰作为方法学考察对象, 以色谱峰保留时间和峰强度的 RSD 为评价指标, 为避免系统误差, 检测顺序随机进行。结果精密度试验中各色谱峰保留时间和峰强度的 RSD 分别为 0.1% ~ 0.6% 和 4.0% ~ 9.7%; 稳定性试验中各色谱峰保留时间和峰强度的 RSD 分别为 0.2% ~ 1.8% 和 3.8% ~ 13.7%; 重复性试验中各色谱峰保留时间和峰强度的 RSD 分别为 0.1% ~ 2.8% 和 2.2% ~ 10.8%, 表明建立的分析方法良好。

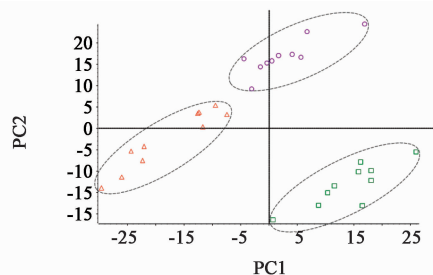


A. 空白组; B. 给药组; C. 关木通提取液组

图 3 大鼠血清 TIC

Fig. 3 TIC chromatograms of representative serum samples

2.8 UFLC-MS/MS 数据分析 原始图谱应用 AB Sciex MarkerView 1.2.1.1 软件进行色谱峰识别、自动峰匹配、峰对齐和归一化处理, 采用主成分分析法 (PCA) 和主成分判别分析法 (PCA-DA) 对各组大鼠血清的代谢物进行分析。PCA 作为无监督学习方法对预处理后的谱图信息进行分类, 给药 14 d 后各组大鼠血清样品的得分图见图 4, 每个点代表 1 个样本,



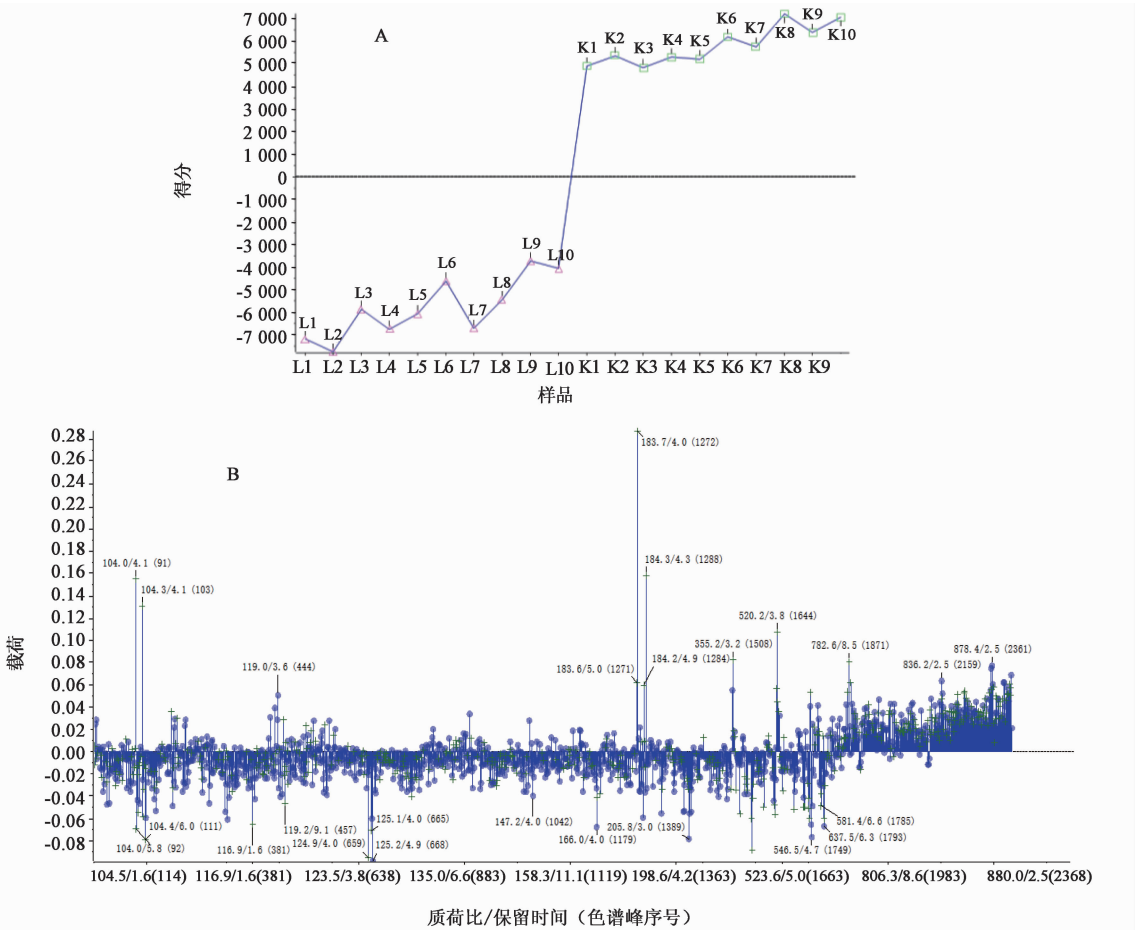
□. 空白组; △. 给药组; ○. 关木通提取液组

图 4 给药 14 d 后血清样品的 PCA 得分

Fig. 4 PCA score plot of serum samples after administration of 14 d

该点在得分图上的位置由该样本中所含内源性代谢物的种类和含量决定。处于相似生理或病理状态的样本一般具有相似的代谢物组,在得分图上处于相近位置,距离越远表明其代谢物组差异越大,所处的生

理或病理状态差异越大,据此可将处于不同状态或不同组别的样本进行分类。结果发现各组在得分图上得到了良好的区分。应用 PCA-DA 对给药 14 d 后给药组和空白组血清样品进行分析,见图 5。



□. 空白组; △. 给药组

图 5 给药 14 d 后血清样品的 PCA-DA 得分 (A) 和载荷 (B)

Fig. 5 PCA-DA score (A) and loading plot (B) of serum samples after administration of 14 d

根据载荷图上各内源性代谢物对聚类趋势的贡献程度,选择远离零点能反映出两组间显著差异的代谢物作为生物标记物。通过正离子一级和二级质谱扫描得到相关的质谱信息,结合文献和在线数据库 (HMDB, METLIN, KEGG) 检索,对生物标记物进行鉴定。以 m/z 496.4 为例解析生物标记物的鉴定过程,通过正离子一级全扫描得 2 个峰度较强的离子 m/z 496.2 和 m/z 478.3, 分别对应 $[M + H]^+$ 和 $[M + H - H_2O]^+$ 离子,该离子的二级质谱碎片主要有 m/z 184.3 和 m/z 104.3, 分别为 $[H_2O_3PO - CH_2CH_2N(CH_3)_3]^+$ 和 $[HOCH_2CH_2N(CH_3)_3]^+$, 是溶血卵磷脂 (LPC) 的特征性碎片^[8], 推测其为 LPC (16:0), 可能的裂解方式见图 6。根据以上结构鉴定方法,经文献查阅和数据库检索,鉴定了 9 个生物

标记物,结果见表 1,标记物在空白组与给药组大鼠血清中的质谱响应强度比较见图 7。

3 讨论

3.1 Cr 和 BUN 浓度的测定和组织病理学观察 肌酐是肌肉代谢后的小分子产物,血中 Cr 浓度主要取决于肾小球的滤过功能,当肾小球滤过率下降到正常值 30% ~ 50% 时,血中 Cr 浓度才明显上升。因为 Cr 与体内肌肉总量关系密切,不易受饮食影响,所以作为检测肾功能的一个重要指标。BUN 是临床上用于评价肾功能的主要指标之一,是人体蛋白质代谢的主要终产物,而肾脏作为排泄尿素的主要器官,各种肾实质性病变,如肾小球肾炎、间质性肾炎、急慢性肾功能衰竭等均可使 BUN 增高。本研究发现在亚急性毒性剂量下,雷公藤乙醇提取物

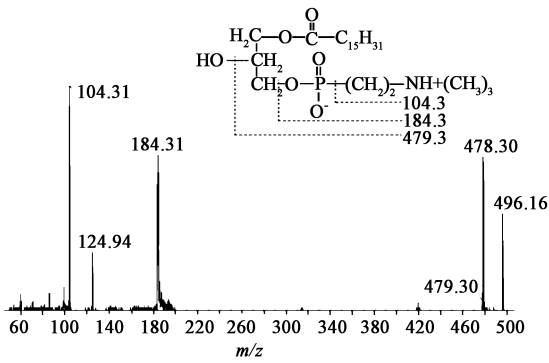


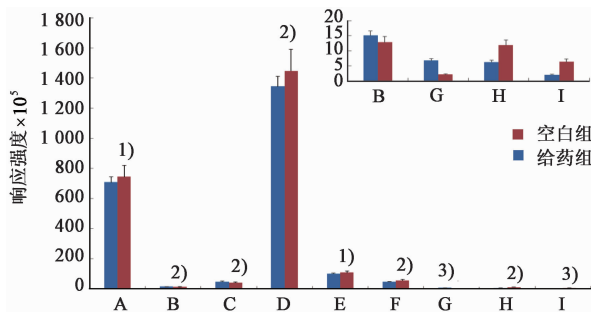
图 6 生物标记物 (m/z 496.4) 在正离子模式下的二级质谱信息及其可能的裂解方式

Fig. 6 Product ion spectrum of biomarker (m/z 496.4) in positive ion mode and its possible MS fragmentation mechanism

表 1 雷公藤致大鼠肾毒性亚急血清的潜在生物标记物

Table 1 Potential serum biomarkers of Radix et Rhizoma Tripterygii-induced nephrotoxicity in subacute toxic dose

t_R/min	m/z	准分子离子	代谢物	变化趋势
4.08	104.0	$[M+H]^+$	二甲基甘氨酸	↑
3.98	147.2	$[M+H]^+$	赖氨酸	↓
4.04	166.0	$[M+H]^+$	苯丙氨酸	↓
4.03	183.7	$[M+H]^+$	肾上腺素	↑
4.05	496.4	$[M+H]^+$	溶血卵磷脂 (16:0)	
	104.3	$[H_2O_3PO-CH_2CH_2N(CH_3)_3]^+$	溶血卵磷脂碎片	↑
	184.3	$[HOCH_2CH_2N(CH_3)_3]^+$	溶血卵磷脂碎片	
3.81	520.2	$[M+H]^+$	溶血卵磷脂 (18:2)	↑
6.28	637.5	$[M+H]^+$	甘油二酯	↓
8.50	782.6	$[M+H]^+$	磷脂酰胆碱	↑
2.47	878.4	$[M+Na]^+$	磷脂酰丝氨酸	↑



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; A. 二甲基甘氨酸; B. 赖氨酸; C. 苯丙氨酸; D. 肾上腺素; E. 溶血卵磷脂 (16:0); F. 溶血卵磷脂 (18:2); G. 甘油二酯; H. 磷脂酰胆碱; I. 磷脂酰丝氨酸

图 7 空白组和给药组生物标记物的全扫强度值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 7 Comparison of full scan intensity of biomarkers between blank group and Radix et Rhizoma Tripterygii ethanol extract group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组的 Cr 和 BUN 水平均显著高于空白组; 显微观察发现肾组织发生了明显病变。确证了亚急性毒性剂量 ($30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 下雷公藤致大鼠肾毒性模型。

3.2 雷公藤致大鼠肾毒性相关的代谢通路

3.2.1 氨基酸代谢 二甲基甘氨酸是经甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 (BHMT) 催化, 由甘氨酸甜菜碱转化而来, 是高半胱氨酸的代谢产物。研究表明高浓度的二甲基甘氨酸可显著抑制 BHMT 活性^[8], 使高半胱氨酸升高, 而高半胱氨酸会导致肾功能衰竭和高同型半胱氨酸血症的发生^[9]。本实验数据分析结果表明, 二甲基甘氨酸是 1 个潜在的生物标记物, 雷公藤乙醇提取物组大鼠血清中二甲基甘氨酸的水平显著高于空白组。因此, 二甲基甘氨酸水平的升高会引起肾脏代谢功能紊乱。赖氨酸、苯丙氨酸是人体必需氨基酸, 在体内用于蛋白质的合成。肾衰竭常伴随多种氨基酸的代谢紊乱, 包括必需氨基酸与非必需氨基酸比例的下降、血清支链氨基酸水平降低等, 这与肾损伤病人对蛋白质和氨基酸的消耗量增加有关。在本研究中, 这 2 种氨基酸均显著降低, 这与临床研究^[10] 结果相符, 表明肾损伤病人体内的氨基酸代谢异常。

3.2.2 磷脂代谢 溶血卵磷脂作为一种具有表面活性的内源性代谢物, 通过调节线粒体膜电位, 使细胞色素 C 转移至细胞浆中, 可破坏多种组织的细胞膜, 从而造成脏器损伤。据报道^[11], 外源性毒性物质可通过提高分泌性磷脂酶 A2 基因的表达, 增加血清分泌型磷脂酶 A2, 使得溶血卵磷脂水平升高, 加重炎症反应并促进细胞凋亡。本研究发现, 溶血卵磷脂在雷公藤乙醇提取物组的浓度显著高于空白组, 这一结果既是雷公藤乙醇提取物导致肾毒性的特征, 又可能是肾毒性发生的内源性物质基础。

磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸是构成细胞膜的主要成分, 在某些肾脏病变条件下, 如肾病综合症发生时, 血清磷脂、胆固醇和甘油三酯呈现升高趋势。目前研究认为, 磷脂升高的原因一方面是由于蛋白尿造成体内蛋白大量流失, 迫使肝脏在代偿性合成蛋白的同时大量合成磷脂; 另一方面, 脂蛋白酯酶活性降低, 导致体内磷脂清除障碍。在实验性肾病综合征研究中发现, 溶血脂酰基转移酶活性增加, 此酶可催化溶血卵磷脂逆向乙酰化为卵磷脂, 使血中磷脂升高^[12]。本研究中雷公藤乙醇提取物组磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸浓度显著高于空白组, 可推断为肾损伤引起的脂质代谢紊乱。甘油二酯是体内脂肪代谢的中间产物, 在降血脂、减少内脏脂肪、抑制体重增加等方面有重要功能^[13], 这些功能主要是通过抑制甘油三酯在体内蓄积实现的。肾脏病变时, 甘油三酯呈升高趋势。本研究中甘油二酯在雷公藤乙

醇提取物组中显著降低,导致甘油三酯显著升高,可推断引起了肾功能损伤。

3.2.3 儿茶酚胺类物质代谢 血清中肾上腺素浓度的升高可能与氧化应激和缺血这 2 个跟肾损伤密切相关的因素有关^[14-15]。而肾上腺素能够对肾脏产生 2 个方面的影响:①肾上腺素能增加肾血管阻力,减少肾血流量而导致肾细胞坏死;②在单胺氧化酶的作用下,肾上腺素能产生直接损害肾细胞的自由基。提示在肾病的诊断和治疗过程中可加强对儿茶酚胺类物质的检测。

3.3 药材制备方法的选择

3.3.1 雷公藤的提取工艺^[16] 比较了回流与超声 2 种提取方法,结果显示前者的提取效率明显高于后者,故选用回流提取法。提取溶剂考察水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷,结果表明乙醇的提取效率最高;结合临床及雷公藤制剂的制备工艺,本研究进行了雷公藤水提组、雷公藤乙醇提取物组和雷公藤乙酸乙酯提取物组的大鼠预试验,根据药物安全性评价及雷公藤临床用药指导原则,分别设计了低、中、高 3 个给药剂量,给药 14 d 后比较各组大鼠的血清生化指标及肾组织切片,结果表明雷公藤水提高剂量组的大鼠染毒不明显,乙酸乙酯高剂量提取组半数染毒,而雷公藤乙醇提取物中剂量组部分染毒,高剂量组全部染毒,肾毒性模型最成功,故选择 95% 乙醇为提取溶剂。

3.3.2 关木通的提取方法 关木通是常见的肾毒性中药,其提取方法多采用水煎^[17],在此基础上考察了溶剂用量、提取次数及提取时间,结果表明加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 2 h,反复煎煮 2 次的提取效率最佳。

本研究采用 UFLC-MS/MS 技术,结合统计学分析方法,从机体内源性代谢产物变化的角度进行了雷公藤致肾毒性血清代谢组学研究,空白组大鼠和肾毒性大鼠的血清代谢产物在 PCA 和 PCA-DA 中得到了明显区分,这与血清生化和组织病理学结果相符,并最终确立了 9 个具有显著分类意义的生物标记物,推测雷公藤通过影响氨基酸代谢、磷脂代谢和儿茶酚胺类物质代谢等生物途径导致肾毒性,为雷公藤致肾毒性的早期诊断和毒性机制研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Lindon J C, Nicholson J K. Analytical technologies for metabolomics and metabolomics, and multi-omic information recovery [J]. Trends Anal Chem, 2008, 27 (3):194-204.
[2] 黄群,杨改红,袁金斌,等. 代谢组学在中药毒理学研

究中的应用[J]. 中药新药与临床药理,2014,25(3):383-388.

[3] Ma J, Dey M, Yang H, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive compounds from *Tripterygium wilfordii* [J]. Phytochemistry, 2007, 68(8):1172-1178.
[4] Bao J, Dai S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: mechanism, efficacy, and safety [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(9):1123-1129.
[5] 李德平,翟华强,曹炜,等. 雷公藤的药学文献回顾及其作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):299-303.
[6] 赵小梅,刘歆颖,续畅,等. 基于 LC-MS 代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19):3851-3858.
[7] Liu X, Xue X, Gong L, et al. ¹H-NMR-based metabolomic analysis of triptolide-induced toxicity in liver-specific cytochrome P450 reductase knockout mice [J]. Metabolomics, 2012, 8(5):907-918.
[8] Allen R H, Stabler S P, Lindenbaum J. Serum betaine, N, N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism [J]. Metabolism, 1993, 42 (11):1448-1460.
[9] Taes Y E, Delanghe J R, Rombaut R, et al. Creatine supplementation decreases homocysteine in an animal model of uremia [J]. Kidney Int, 2003, 64(4):1331-1337.
[10] 杨宏,江骥,胡蓓. 慢性肾衰时蛋白质和氨基酸代谢的研究[J]. 中国临床营养杂志, 2001, 9(3):175-177.
[11] Huang Y, Fu J F, Shi H B. Metformin prevents non-alcoholic fatty liver disease in rats: role of phospholipase A2/lysophosphatidylcholine lipoapoptosis pathway in hepatocytes [J]. Chin J Pediatr, 2011, 49(2):139-145.
[12] 李瑞君,王昆兰,周蓉. 苯扎贝特治疗肾病综合症高脂血症疗效观察 [J]. 中国现代应用药学, 2005, 22 (2):170-172.
[13] 孟祥河,毛忠贵,高保军,等. 甘油二酯的应用现状 [J]. 中国食品添加剂, 2002(4):58-61.
[14] Rahman A, Ahmed S, Vasenwala S M, et al. Glycerol trinitrate, a nitric oxide donor, abrogates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and renal damage [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 418(1):71-79.
[15] Maldonado P D, Barrera D, Medina-Campos O N, et al. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats [J]. Life Sci, 2003, 73(20):2543-2556.
[16] 巴文强,王利胜,王珂,等. 正交试验优选雷公藤提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14):16-19.
[17] 赵剑宇,颜贤忠,彭双清. 关木通肾毒性的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5):725-730.

[责任编辑 刘德文]