

氨基酸代谢组学在药物性肝损伤中的研究进展

赵霞霞^{1,2}, 吴杰², 王瑞玲² (1.火箭军总医院 消化内科, 北京 100088; 2.锦州医科大学, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 药物性肝损伤 (drug induced liver injury, DILI) 是指药物本身的作用、药物相互作用及药物代谢产物等引起的肝功能损伤, 可引起各种临床症状和体征。各种药物 (抗生素类、抗结核类、心血管类、胃肠道类、抗真菌类、抗癫痫、抗肿瘤类及一些中药如首乌片、马钱子等) 导致的DILI均可造成人体内代谢失衡。代谢组学 (metabolomics, MS) 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学后迅速发展的一门组学。肝细胞严重损伤时会引起氨基酸代谢障碍和紊乱, 尤其是支链氨基酸与芳香族氨基酸比值发生改变。本文就氨基酸代谢组学在药物性肝损伤中的研究进展进行综述。

关键词: 肝功能损伤, 药物性; 氨基酸; 代谢组学

Research progress of amino acid metabolomics on drug-induced liver injury

ZHAO Xia-xia^{1,2}, WU Jie², WANG Rui-ling² (1.Department of Gastroenterology, Rocket General Hospital, Beijing 100088, China; 2.Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China)

Abstract: Drug induced liver injury (DILI) refers to liver function damage caused by the action of drugs themselves, drug interactions and drug metabolites, which can cause various clinical symptoms and signs. DILI caused by various drugs (antibiotics, anti-tuberculosis, cardiovascular, gastrointestinal, antifungal, antiepileptic, anti-tumor and some traditional Chinese medicine such as shou wu tablets, strychnion, etc.) can lead to metabolic imbalance in human body. Metabolomics (MS) is a rapidly developing “omics” after genomics, transcriptomics and proteomics. The severe injury of liver cells can cause the disorder and disorder of amino acid metabolism, especially the change of the ratio of branched amino acids to aromatic amino acids. This paper reviewed the research progress of amino acid metabolomics on DILI.

Key words: Drug-induced liver damage; Amino acids; Metabolomics

1 药物性肝损伤的发病机制及分类

药物性肝损伤 (drug induced liver injury, DILI) 发病率呈逐年上升趋势, 近年来随着人口老龄化、保健品及药物的大量使用, 药物性肝损伤等不良反应也逐渐增加。国内DILI约占有所有药物不良反应的10%~15%, 年发病率为(1~10)人/10万^[1], 在北美国家, 一般人群中DILI的发病率为(14~19)人/10万, 在医院、医疗保健体系中为(30~33)人/10万^[2]。肝细胞膜损伤、胆汁淤积、胆小管受损及线粒体功能障碍均可引起DILI^[3], 其也与细胞色素P450酶代谢异常、钙离子平衡破坏、自身免疫激活、信号转导、遗传及环境等相关^[4,5]。DILI常见发病机制包括应激途径激活、细胞器功能损害、氧化应激、DNA损伤、细胞周期改变和细胞骨架完整性破坏等^[6,7]。

特异性DILI的分子危险因素包括药物亲脂性、高剂量、高代谢率、药物-宿主相互作用及可能引发肝功能损伤的遗传因素。自身免疫性DILI占DILI的2%~17%, 是其危险因素之一^[8], 这些特定风险因素通常具有潜在的免疫介导机制, 但由于缺少药物潜在的肝功能损伤相关信息, 加大了自身免疫性DILI的研究难度^[7]。细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450) 是肝细胞中最重要的代谢酶, 参与绝大多数药物的代谢, 可使大部分代谢物极性增加、水溶性增高、药理活性减弱, 并产生亲电子基、自由基等活性代谢产物^[9]。新近研究发现, 某些曾经被禁止、撤回的引起严重DILI的药物, 是基于活性氧和腺苷三磷酸诱导的DILI^[10], 这正是对某些类型DILI认识不足所致。

1.1 肝细胞损伤型 DILI 肝细胞损伤是多因素介导的复杂生物反应过程, 以肝细胞型最多见, 占 DILI 的 63%^[5]。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是体内

反应性代谢产物的天然清除剂,对氧自由基、氢过氧化物、亲电子基团等的清除起着重要作用^[3]。过量服用药物或遗传性药物代谢异常时,亲电子基团和自由基等活性代谢产物大量生成,耗尽了肝内的GSH,通过与细胞膜磷脂质的不饱和脂肪酸结合发生脂质过氧化反应,造成膜功能损伤^[3,9];同时,钙-三磷酸腺苷的自身稳定性遭到破坏,导致线粒体损伤和肝细胞坏死。自由基还可通过与半胱氨酸残基的巯基、赖氨酸残基的氨基亲核基团共价结合,使肌动蛋白凝聚而破坏细胞骨架,细胞膜失去生理生化特性,最终导致肝细胞坏死^[3]。过量N-乙酰对氨基苯酚诱导的肝损伤早期就伴随GSH的消耗,并随之消耗GSH含硫代谢物,同时改变线粒体和糖酵解的代谢产物,肝细胞能量稳态遭到破坏^[11,12]。凝血酶原抑制剂可与配体肽竞争结合位点,使肝脏中蛋白质的表达发生变化,如GSH转移酶活性上调、花生四烯酸代谢有关的蛋白质下调^[11],其机制尚待阐明。

1.2 胆汁淤积型 DILI 胆汁淤积型 DILI 是胆汁酸稳态和肝细胞极性结构破坏导致的胆汁酸排泄障碍或肝循环障碍,占 DILI 的 17%^[6]。肝细胞极化的机制调节由复杂的细胞骨架成分、细胞内搬运组件、运输系统及一些细胞骨架紧密连接方式组成,这些细胞骨架紧密连接方式是肝细胞极化的重要结构,其可维持黏膜上皮的机械屏障和渗透性,肝细胞极化对胆汁分泌至关重要^[12]。发生 DILI 时,P450 酶产生的亲电子基和氧自由基与肝细胞蛋白半胱氨酸残基的巯基、赖氨酸残基的氨基亲核基团共价结合^[3],使肌动蛋白凝聚而破坏细胞骨架,导致胆汁酸转运蛋白和肝紧密连接结构改变。细胞极性结构破坏,肝胆屏障功能紊乱,产生胆汁淤积^[12]。线粒体在胆汁酸的毒性中起着核心作用,当胆汁酸浓度超过位于肝细胞胞质溶胶中结合蛋白的结合能力时,胆汁酸通过损伤线粒体而诱导其凋亡和坏死,高浓度胆汁酸、糖唾液酸脱氧胆酸和牛磺神经脱氧胆酸均可降低琥珀酸激发时产生的线粒体膜电位,增加线粒体膜的渗透性,造成线粒体呼吸链功能障碍,最终导致胆汁淤积型 DILI^[13]。胆汁淤积型 DILI 还可能由 CYP 或其辅酶介导的代谢物活化所致,引起内质网或线粒体的氧化应激^[14]。脂肪变化是由线粒体呼吸链功能障碍引起的^[15],反映了含有长链脂肪酸甘油三酯的代谢异常,这是线粒体的主要能量来源。药物开发过程中,在动物体内检测到的肝细胞脂肪变是由所考虑药物导致的线粒体功能障碍引起的^[15,16],此外,特异性 DILI 与免疫系统诱发的细胞死亡和细胞凋

亡等也有相关性^[16]。关于混合型 DILI 目前文献报道甚少。

2 氨基酸代谢失衡在 DILI 的表现

代谢组学(metabolomics, MS)是研究定量测量生物系统(细胞模型、组织、器官或整个有机体)全部代谢物的组成,通常为相对分子质量在 1000 以下的小分子代谢物质,以及这些代谢物在各种刺激下动态改变的科学^[17]。它是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后发展起来的一门组学技术。常用 MS 技术有色谱法(chromatography, GC)、质谱法(mass spectrometry, MS)及核磁共振法(nuclear magnetic resonance, NMR)。肝脏是氨基酸新陈代谢的重要器官,对氨基酸代谢平衡具有重要作用^[18]。当肝细胞严重损伤时会引起氨基酸代谢障碍和紊乱,尤其是支链氨基酸与芳香族氨基酸比值发生改变。根据该比值的改变既可预测肝性脑病,又可判断肝脏疾病的严重程度。代谢特征的差异及 DILI 组间代谢产物氨基酸的不同可解释其诱导 DILI 的不同机制^[19]。

2.1 肝纤维化氨基酸失衡表现 肝纤维化是由药物、病毒及自身免疫等引起的慢性肝功能损伤^[20]。一项关于 CCl₄ 诱导的肝纤维化研究发现,在 CCl₄ 诱导的大鼠血清中,组氨酸、苯丙氨酸和精氨酸浓度上调,表明肝纤维化可能与代谢途径的功能障碍有关,包括葡萄糖、氨基酸、P450、脂肪酸、核酸、水、电解质和 GSH 的生物合成等^[14]。

2.2 急性 DILI 氨基酸失衡表现 在急性 DILI 中,除支链氨基酸水平大体正常外,其他氨基酸水平均显著升高,其中甲硫氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、谷氨酸和天门冬氨酸水平显著升高,以甲硫氨酸最突出,可达正常值的 27 倍^[21]。Gonzalez 等^[22]采用超高效液相色谱法研究半乳糖胺处理的大鼠血清,寻找急性 DILI 的潜在生物标志物,其中血液代谢标志物包括蛋氨酸、苏氨酸或酪氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和鞘磷脂、葡萄糖、β-羟基丁酸及 5-羟基吡啶乙酸等。另有研究表明,原烯酸诱导的急性 DILI 与酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和牛磺酸等氨基酸的代谢紊乱相关,且肠道菌群、脂质和碳水化合物代谢紊乱也参与了急性 DILI 的发展过程^[23]。

2.3 慢性 DILI 氨基酸失衡表现 慢性 DILI 以支链氨基酸水平降低、芳香族氨基酸水平升高为特征^[24]。慢性 DILI 时,芳香族氨基酸(异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸)、丙氨酸、蛋氨酸、鸟氨酸和脯氨酸水平显著升高,而血清胱氨酸水平显著降低^[25]。由于慢性 DILI 病因复杂,其机制有待进一步阐明。

2.4 暴发性肝功能衰竭时氨基酸失衡表现 芳香族氨基酸如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和溶血磷脂酰胆碱是评估暴发性肝功能衰竭严重程度的较好标志物,以苯丙氨酸和溶血磷脂酰胆碱失衡最明显,而一些共轭胆汁酸、长链酰基肉碱和甘氨酸可用于评估早期暴发性肝功能衰竭^[25]。过量 N-乙酰对氨基苯酚诱导的早期 DILI 就伴随 GSH 的消耗, GSH 耗竭伴随琥珀酸、缬氨酸、2-氨基己二酸和谷氨酸水平升高^[11],同时线粒体和糖酵解代谢产物也发生改变,表明肝细胞能量稳态受到破坏。

3 氨基酸代谢在 DILI 治疗中的研究进展

3.1 纤维化导致的肝功能损伤的治疗 支链氨基酸 1, 7-二羟基-3, 4, 8-三甲氧基酮对二甲基亚硝胺诱导的大鼠模型具有抗纤维化作用^[14]。研究表明,支链氨基酸可刺激抗氧化剂对所 CCl₄ 诱导 DNA 损伤的修复,口服支链氨基酸不仅能改善血清白蛋白、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)浓度,也可改善患者血浆氨基酸不平衡并减少肝功能衰竭的发生^[26]。

3.2 急性 DILI 的治疗 氨基酸对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用,赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸、精氨酸和天冬氨酸可显著抑制一氧化氮的产生及一氧化氮合酶的表达。其中,赖氨酸、色氨酸、组氨酸和精氨酸还可减少转录因子的活化,抑制炎症反应^[27]。

3.3 胆汁淤积型 DILI 的治疗 甘氨酸不仅能减少线粒体肿胀、活性氧和脂质过氧化,而且可改善线粒体膜电位并恢复肝线粒体腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)^[28,29],甘氨酸对胆汁淤积型 DILI 的治疗作用可能与其保持细胞氧化还原环境、防止氧化应激及维持线粒体功能有关。

3.4 其他类型 DILI 的治疗 s-烯丙基胱氨酸和甲硫氨酸衍生的新型席夫碱聚合物可通过自身作为抗氧化剂并降低氧化应激来保护肝功能,其可能减少肝脏中 CCl₄ 对胞内细胞器的毒性作用^[30,31],降低肝功能损伤标志物(如 AST、ALT、谷氨酰转氨酶、ALP 和乳酸脱氢酶)和生物分子(胆红素)向血液中的渗漏。对乙酰氨基酚是一种临床广泛使用的镇痛药和退热药,高剂量使用时会发生 DILI 和肾毒性等不良反应。研究表明, L-半胱氨酸混合物对对乙酰氨基酚诱导的肝毒性具有比 L-甲硫氨酸、L-丝氨酸和 N-乙酰半胱氨酸更好的保护作用^[32]。

4 氨基酸代谢在 DILI 的研究前景

氨基酸是生命的基石,疾病的发生与健康状况

都与氨基酸有直接或间接关联。氨基酸涉及代谢、肿瘤、免疫、心血管、神经系统、肾脏、糖尿病及老年病等,与人体生长发育、营养健康、肌肉骨骼生长和激素分泌等各个环节密切相关,氨基酸代谢失衡严重影响机体功能。近年来 MS 技术发展迅速,通过分析在尿液和血液中内源性氨基酸代谢物的动态变化,可确定药物及其毒性在器官的作用部位、推测药物的影响和潜在的 DILI 生物标志物^[24]。寻找特异性好、灵敏度高的 DILI 生物标志物^[26],不断探索、研究氨基酸和蛋白质相关 DILI 生物标志物将为 DILI 的预测和预防提供依据,是目前的研究热点。

DILI 如损伤模式的不同类型、复杂的病理学表现和相关的临床进展等^[9,32]。药物活性代谢物对肝细胞蛋白的共价修饰是 DILI 发生的风险因素。可用于诊断 DILI 的复杂生物蛋白质修饰加合物,的预测研究将是一个挑战^[9]。药物与个体异质的相互作用也是特异性 DILI 发生的诱因^[33,34]。目前氨基酸代谢失衡在 DILI 中的研究尚存在不足,一方面, DILI 的诊断尚无特异性高、敏感性强的生物标志物^[32];另一方面,潜在药物毒性具有可变性和多样性, DILI 的分子事件大多是未知的^[16]。

氨基酸代谢存在于生物体的各个细胞中,可参与蛋白质合成并为核酸、脂质的合成提供基团等。氨基酸的新陈代谢主要在肝脏中进行,当肝细胞严重损伤时会引起氨基酸代谢障碍和紊乱。通过研究这些发生显著变化的氨基酸,可进一步明确 DILI 的发生、发展机制,促进新检测技术的研发,氨基酸代谢组学将为 DILI 的预防和诊疗提供新的研究途径,具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] 吴海洋,刘桦. 药物性肝脏损害临床分析及护理措施[J]. 健康导报:医学版,2015,20(8):106-107.
- [2] Chen M, Suzuki A, Borlak J, et al. Drug-induced liver injury: interactions between drug properties and host factors[J]. J Hepatol, 2015,63(2):503-514.
- [3] 何亮伟,耿婷,李艳静,等. 谷胱甘肽反应性代谢物引起药物性肝损伤的机制研究进展[J]. 中国药房,2017,28(7):990-994.
- [4] Teschke R, Schulze J, Eickhoff A, et al. Drug induced liver injury: can biomarkers assist RUCAM in causality assessment?[J]. Int J Mol Sci,2017,18(4).pii: E803.
- [5] 许新,纪莉莎,陈丽丽,等. 药物性肝功能损伤的临床特征及影响因素分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(1):49-52.
- [6] 许国旺,路鑫,杨胜利. 代谢组学研究进展[J]. 中国医学科学院学报,2007,29(6):701-711.
- [7] Schliess F, Hoehme S, Henkel SG, et al. Integrated metabolic spatial-temporal model for the prediction of ammonia detoxification during

- liver damage and regeneration[J]. *Hepatology*,2014,60(6):2040-2051.
- [8] Thakkar S, Chen M, Fang H, et al. The liver toxicity knowledge base (LKTb) and drug-induced liver injury (DILI) classification for assessment of human liver injury[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*,2018,12(1):31-38.
- [9] 周晓丽, 梁庆升, 孙颖, 等. 自身免疫样药物性肝损伤研究进展[J]. *肝脏*,2017,22(5):460-463.
- [10] 程元恺. 谷胱甘肽的解毒作用与毒性代谢物[J]. *生物化学与生物物理进展*,1994,21(5):395-399.
- [11] Goda K, Kobayashi A, Takahashi A, et al. Evaluation of the potential risk of drugs to induce hepatotoxicity in human-relationships between hepatic steatosis observed in non-clinical toxicity study and hepatotoxicity in humans[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(4):pii: E810.
- [12] Zhang J, Doshi U, Suzuki A, et al. Evaluation of multiple mechanism-based toxicity endpoints in primary cultured human hepatocytes for the identification of drugs with clinical hepatotoxicity: results from 152 marketed drugs with known liver injury profiles[J]. *Chem Biol Interact*,2016,255:3-11.
- [13] Kyriakides M, Maitre L, Stamper BD, et al. Comparative metabolomic analysis of hepatotoxicity induced by acetaminophen and its less toxic meta-isomer[J]. *Arch Toxicol*,2016,90(12):3073-3085.
- [14] Yang T, Mei H, Xu D, et al. Early indications of ANIT-induced cholestatic liver injury: alteration of hepatocyte polarization and bile acid homeostasis[J]. *Food Chem Toxicol*,2017,110:1-12.
- [15] Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids[J]. *Toxicology*,2004,203(1/3):1-15.
- [16] Goda K, Kobayashi A, Takahashi A, et al. Evaluation of the potential risk of drugs to induce hepatotoxicity in human-relationships between hepatic steatosis observed in non-clinical toxicity study and hepatotoxicity in humans[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(4):pii: E810.
- [17] Teschke R, Danan G. Molecular research on drug induced liver injury[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(1):pii: E216.
- [18] 叶青, 肖慧娟, 韩涛, 等. 肝硬化患者的营养不良状态和体成分分析[J]. *中华肝脏病杂志*,2016,24(5):380-383.
- [19] Xu Y, Li Y, Yang F, et al. Metabolic profiling of fifteen amino acids in serum of chemical-induced liver injured rats by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *Metabolomics*,2012,8(3):475-483.
- [20] Gomes J, Dawodu AH, Lloyd O, et al. Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides[J]. *Human Exp Toxicol*,1999,18(1):33-37.
- [21] Guardiola JJ, Beier JJ, Falkner KC, et al. Occupational exposures at a polyvinyl chloride production facility are associated with significant changes to the plasma metabolome[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2016,313:47-56.
- [22] Gonzalez E, van Liempd S, Conde-Vancells J, et al. Serum UPLC-MS/MS metabolic profiling in an experimental model for acute-liver injury reveals potential biomarkers for hepatotoxicity[J]. *Metabolomics*,2012,8(6):997-1011.
- [23] Chen Y, Duan JA, Guo J, et al. Yuanhuapine-induced intestinal and hepatotoxicity were correlated with disturbance of amino acids, lipids, carbohydrate metabolism and gut microflora function: A rat urine metabolomic study[J]. *J Chromatogr B*,2016,1026(12):183-192.
- [24] Zhou P, Li J, Shao L, et al. Dynamic patterns of serum metabolites in fulminant hepatic failure pigs[J]. *Metabolomics*,2012,8:869-879.
- [25] 冯小平, 蒋滢. 急性肝损伤时氨基酸代谢变化的研究现状[J]. *氨基酸和生物资源*,1993,33(1):26-29.
- [26] 明雅南, 刘晓琳, 茅益民. 药物性肝损伤发病机制研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*,2014,17(6):657-660.
- [27] Heidari R, Ghanbarinejad V, Mohammadi H, et al. Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of glycine in cholestatic mice[J]. *Biomed Pharm*,2018,97:1086-1095.
- [28] Di Pierro F, Rossoni G. An amino acids mixture improves the hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice[J]. *J Amino Acids*,2013,2013:615754.
- [29] Ratha P, Chitra L, Ancy I, et al. New amino acid-Schiff base derived from s-allyl cysteine and methionine alleviates carbon tetrachloride-induced liver dysfunction[J]. *Biochimie*,2017,138:70-81.
- [30] Hirasawa M, Hagihara K, Abe K, et al. In silico and in vitro analysis of interaction between ximelagatran and human leukocyte antigen (HLA)-DRB1*07:01[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(4):pii: E694.
- [31] 明雅南, 刘晓琳, 茅益民. 药物性肝损伤发病机制研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*,2014,17(6):657-660.
- [32] Iorga A, Dara L, Kaplowitz N. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(5):pii: E1018.
- [33] 王世伟, 谢雯. 高迁移率族蛋白-1在药物性肝损伤中的研究进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2018,10(2):1-5.
- [34] 常彬霞, 邹正升, 李保森. 美国胃肠病协会临床指南:特发性药物性肝损伤的推荐意见[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2015,7(1):123-124.

收稿日期: 2018-11-27

赵霞霞, 吴杰, 王瑞玲. 氨基酸代谢组学在药物性肝损伤中的研究进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2019,11(4):28-31.