

核磁共振技术测试不同性别大鼠 尿液代谢物的研究

巴吐尔·买买提明^{1,2}, 买买提·艾买提³,
阿仙姑·哈斯木⁴, 衣不拉音·斯马义¹

(1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 中南大学 药学院, 湖南 长沙 410007;
3. 哈密地区药品检验所, 新疆 哈密 839000; 4. 新疆医科大学 基础医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 采用核磁共振波谱技术测试不同性别大鼠尿液代谢物, 分析性别因素对大鼠尿液代谢成分的影响. 大鼠尿液核磁共振氢谱(¹H NMR 谱)结果采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal to partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)方法分析, 得到不同性别大鼠尿液中的差异性代谢物. PCA 分析结果显示2组尿液代谢成分有明显的差异, 进一步进行 OPLS-DA 分析可以判别出2组尿液中具有差异性的代谢物. 结果显示, 雌性大鼠尿液中的丙氨酸、缬氨酸、鸟氨酸等氨基酸类以及乙酸、硫酸、氨基马尿酸、苯乙胺、氧氮嘧啶等代谢物含量高于雄性大鼠, 差异有统计学意义($p < 0.05$). 雄性大鼠尿液中的甲胺、二甲胺、三甲胺、肌酸酐、尿酸素、延胡索酸、甲酸等代谢物则明显高于雌性大鼠, 差异有统计学意义($p < 0.05$). 性别因素对大鼠尿液中的代谢成分有一定的影响.

关键词: 代谢组学; 核磁共振; 性别差异

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2010)03-0157-05

代谢组学是采用核磁共振、质谱等化学分析技术结合化学计量学方法, 分析生物体液中复杂成分的动态变化, 解析代谢物指纹图谱, 从而研究生物体整体性变化机制的一门新兴学科^[1,2]. 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)波谱技术作为最理想的测试技术之一, 被广泛的应用到代谢组学研究中, 尤其是运用高分辨 NMR 技术对体液内许多微量代谢组分进行检测、分析和评价越来越引起人们极大的兴趣, 并显示出重要的作用^[3-5]. NMR 测试能在一次单独的检测中获得生物体中上百个含氢化合物的代谢物组分信息, 而无需预先确定被检测物质的性质, 具有较高的灵敏度和较好的重复性、没有偏向性、接近生理条件下进行检测等特点. 此外, NMR 所需样品量较少, 不需要复杂的样品处理或衍生措施, 且样品还可回收用于其他分析.

研究显示, 体内的各种生理或病理变化都会导

致体液中代谢物的变化, 对这些变化进行数据采集、分析可以帮助我们找到与这种变化密切相关的生物学基础, 还可以更快速、准确的诊断疾病. 目前, 基于 NMR 的代谢组学研究在寻找与疾病相关的生物标记物方面取得了一定进展^[6-8]. 然而, 体内代谢受多种因素的影响, 包括年龄、性别、生理状态、种族、生活环境等. 本研究选用不同性别 Wistar 大鼠为研究对象, 采用 NMR 技术分析不同性别大鼠尿液中的差异性代谢成分, 讨论性别因素对代谢的影响程度.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Inova600 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司), 低温离心机(德国, Eppendorf 股份公司). 重水(美国 Cambridge Isotope Laboratories, Inc 产品). 3-trimethylsilyl-²H₄-propionic acid (TSP, 美国 Sigma

收稿日期: 2010-05-24; 修订日期: 2010-07-26.

基金项目: 新疆医科大学创新基金(No. 2007-13).

作者简介: 巴吐尔·买买提明(1972-), 男, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为维医维药与代谢组学. Tel: 0991-4365034,

Email: mtbatu@yahoo.com.cn

公司产品). K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 (天津市光复精细化工研究所).

1.2 实验动物

Wistar 大鼠, 普通级, 体重 180 ~ 260 g, 雌雄各 8 只, 由新疆医科大学实验动物中心提供.

1.3 样品制备

动物在普通环境中饲养, 用代谢笼收集 24 h 尿液并在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 低温冰箱中保存, 待测. 每个尿液样本各取 400 μL , 每个样本加入 200 μL 含 0.05% TSP 的重水配制的磷酸缓冲液 ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 1.5 mol/L, pH = 7.4) 中, 室温放置 10 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min. 取上清液 550 μL 放入 5 mm 核磁管中.

1.4 样品测定

用 Inova600 型核磁共振波谱仪调用 NOESYPRESAT-1D ($\text{RD}-90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ-\text{ACQ}$) 脉冲序列进行氢谱测定. TSP 作为内标, 其化学位移定为 0 ppm. 采用预饱和方式抑制水峰, 饱和时间为 2 s, 谱宽 10 000 Hz, 采样点数 32 k, 扫描次数为 128 次, 测试温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$. 以解谱为目的, 部分样品测试了 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 同核相关谱 (COSY 谱)、质子全相关谱 (TOCSY 谱)、J-分解谱 (J-Resolved 谱) 等核磁共振二维谱.

1.5 图谱处理和分析

尿样 ^1H 核磁共振图谱 (^1H NMR 谱) 进行基线及相位调整后选择 δ_{H} 为 10.0 ~ 0.5 ppm 的区域进行自动积分, 积分区间设为 0.003 ppm. 为了消除饮水量对代谢物浓度的影响, 积分值进行归一化处理 (每一段积分值除于所有积分值之和) 并用 SIMCA-P⁺ (瑞士) 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA). PCA 主要用于观察 2 组样本是否有差异性, 而 2 组中具有差异性的积分段的判断则用 OPLS-DA. 通过 OPLS-DA 获得的每一个积分段所代表的代谢物相关系数 (r) 来确定不同性别大鼠尿液的差异性代谢成分, 检验标准为 p 为 0.05. 在本研究中, 根据皮尔森相关系数显著性差异检测 (Pearson's product moment correlation coefficient) 确定 $|r|$ 大于 0.632 (样品数 n 为 8) 所代表的代谢物是统计学上有显著性差异 (p 小于 0.05) 的代谢物临界值. $|r|$ 值越大表示差异性越大, 反之越小.

2 结果与讨论

不同性别大鼠尿液的 ^1H -NMR 谱如图 1, 图 1 中指出的峰是 2 组中有差异的积分段, 对应的代谢物见表 1. 对 ^1H -NMR 谱进行分段积分以后的积分值进行 PCA 和 OPLS-DA 分析得到相应的得分图 (scores plots), 见图 2. 从 PCA 分析图中我们可以看到 2 组完全分布在得分图的 2 个区域, 说明 2 组大鼠尿液代谢成分有明显的差异. 为了确定 2 组尿液中的差异性代谢成分, 对数据进一步进行 OPLS-DA 分析. OPLS-DA 分析中模型的累积预测程度 Q^2 为 0.87, 可见分析结果的可靠性较高. 根据 OPLS-DA 分析相关系数确定 2 组尿液中差异性代谢成分的化学位移并根据代谢组学数据库 (<http://www.hmdb.ca>) 数据结合所测试的核磁共振二维谱最终确定差异性代谢物, 详见表 1. 差异性代谢物中相关系数为正值的代谢物是在雄性大鼠尿液中的含量比雌性高的代谢物, 相关系数为负值的代谢物是在雌性大鼠尿液中的含量比雄性高的代谢物.

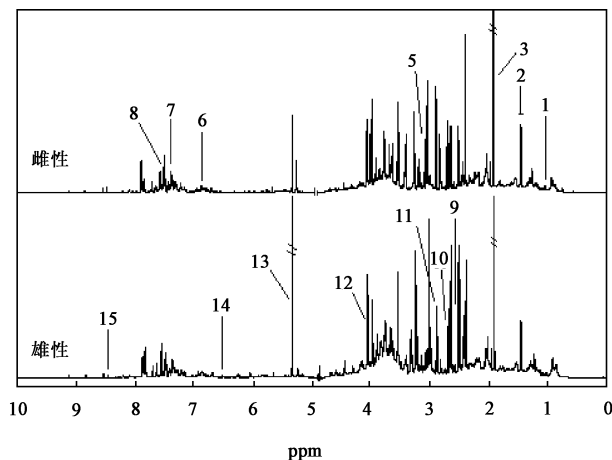


图 1 不同性别大鼠尿液 ^1H -NMR 谱

Fig.1 600 MHz ^1H -NMR spectra of urine samples from male and female Wistar rats

从结果中可以发现, 雌性大鼠尿液丙氨酸、缬氨酸、鸟氨酸等氨基酸明显高于雄性大鼠, 差异有统计学意义 (p 小于 0.05). 同时, 乙酸、硫酸、氨基马尿酸、苯乙胺、氧氮嘧啶等代谢物含量也高于雄性大鼠, 差异有统计学意义 (p 小于 0.05). 雄性大鼠尿液中的甲胺、二甲胺、三甲胺、肌酸酐、尿囊素、延胡索酸、甲酸等代谢物明显高于雌性大鼠, 差异有统计学意义 (p 小于 0.05).

表1 雄性及雌性 Wistar 大鼠尿液主要差异性代谢物及其相关系数

Table 1 Difference in metabolites of urine samples from male and female Wistar rats and correlation coefficients				
序号	代谢物	归属	化学位移	相关系数
1	缬氨酸	CH ₃ , CH ₃	0.98(d), 1.04(d)	-0.8
2	丙氨酸	CH ₃ , α-CH	1.47(d), 3.76(q)	-0.74
3	乙酸	CH ₃	1.92(s)	-0.68
4	硫胺	CH ₃ , CH ₃ , CH ₂	2.50(s), 2.56(s), 5.45(s)	-0.69
5	鸟氨酸	δ-CH ₃ , α-CH	3.07(t), 3.79(t)	-0.85
6	氨基马尿酸	H3/H5, H2/H6	6.86(d), 7.68(d)	-0.66
7	苯乙胺	CH ₂ NH ₂ , H4, H3	3.31(t), 7.38(s), 7.43(t)	-0.81
8	氧氨嘧啶	H5, H6	5.99(d), 7.52(d)	-0.77
9	甲胺	CH ₃	2.60(s)	0.79
10	二甲胺	CH ₃	2.72(s)	0.87
11	三甲胺	CH ₃	2.92(s)	0.73
12	肌酸酐	CH ₂	3.05(s), 4.06(s)	0.67
13	尿囊素	CH	5.37(s)	0.64
14	延胡索酸	CH	6.53(s)	0.64
15	甲酸	CH	8.46(s)	0.78

s:单峰(singlet), d:双重峰(doublet), t:三重峰(triplet);相关系数为正值的代谢物在雄性大鼠尿液中的含量比雌性高,相关系数为负的代谢物在雌性大鼠尿液中的含量比雄性高.

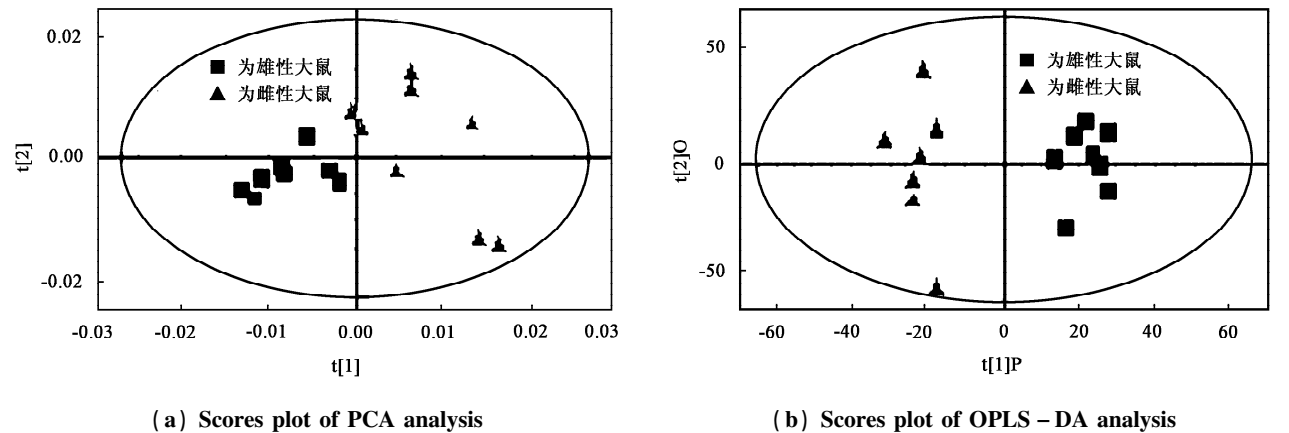


图2 不同性别大鼠尿液的¹H-NMR谱PCA得分图(a)和OPLS-DA得分图(b)

OPLS-DA 参数分别为 $R^2X=0.44$ 、 $R^2Y=0.96$ 、 $Q^2=0.87$

Fig. 2 Gender discriminative performance of Wistar rat

OPLS-DA parameters are $R^2X=0.44$, $R^2Y=0.96$, $Q^2=0.87$ respectively

代谢组学作为生命科学新的研究方法,与基因组学、转录组学和蛋白组学一样是生命科学研究中的主要手段.NMR技术作为代谢组学研究中应用最广泛的分析测试方法,以可在接近生理条件下进行测试的优点越来越受到重视.本研究采用的NOESYPRESAT序列常用于尿液、血液¹H NMR谱的测试中^[9-10].NOESYPRESAT序列的本质与压水序列PRESAT方法一致,但其结果优于PRESAT,因为

NOESYPRESAT序列在弛豫时间和混合时间段2次对水峰进行饱和,可得到较好的水峰抑制效果和较平直的基线,同时采用较高的数字分辨率和较长的弛豫延迟,以保证能够区分化学位移相近的谱峰,且能够得到准确的积分.

本研究测试了不同性别大鼠尿液的NOESYPRESAT序列¹H NMR谱并对其结果进行了模式识别分析.结果显示,雌性大鼠尿液中丙氨酸、

缬氨酸、鸟氨酸等氨基酸含量比雄性大鼠高。另外,雌性大鼠尿液中硫胺、氨基马尿酸、苯乙胺、氧氮嘧啶含量也均高于雄性大鼠,尿液中的氨基酸含量与蛋白质的合成成反比关系,所以,雌性大鼠对氨基酸的利用率可能比雄性低。马尿酸是从食物摄入的苯甲酸输送到肝脏,在 ATP、 Mg^{2+} 、CoA 的共同作用下,肽键和甘氨酸结合生成的化合物,雌性大鼠尿液中的高氨基马尿酸含量说明此反应过程比雄性强。苯乙胺具有诱导儿茶酚胺生成的作用,具有“情绪激素”的俗称,这可能是女性比较容易“激动”的原因。硫胺也叫维生素 B1,是人体能量代谢,特别是糖代谢所必需的,对神经组织及精神状态有十分重要的影响。氧氮嘧啶是核酸中的主要碱基组成成分之一,其含量的变化可能与体内激素水平的变化有关。雌激素可能是上述代谢物含量在雌性大鼠尿液中高的原因。

雄性大鼠尿液中甲胺、二甲胺、三甲胺等代谢物比雌性大鼠高。甲胺是氨的烃基衍生物,属碱性物质,有局部刺激、拟交感神经活性、释放组胺等作用。甲胺能被甲基化形成二甲胺和三甲胺,直接自尿中排出。不管是人类,还是动物其从尿液排出的二甲胺、三甲胺有很高的个体差异性^[11,12],而且受饮食习惯^[13]和体内激素水平的影响^[14],所以,雄性大鼠尿液中的二甲胺和三甲胺含量可能反映体内激素水平的不同。另外,雄性大鼠尿液中的肌酸酐、尿囊素、延胡索酸、甲酸等代谢物含量比雌性大鼠高。肌酸酐是肌酸和磷酸肌酸代谢的终产物,而肌酸和磷酸肌酸是能量储存、利用的重要化合物。尿液中的肌酸酐含量与体重密切相关,尤其是其含量直接表示骨骼肌的质量。尿囊素是尿酸的衍生物,具有一定的抗氧化活性,而延胡索酸和甲酸分别是三羧酸循环的中间产物和脂肪的分解产物,以上代谢物的差异说明雄性和雌性大鼠体内的能量代谢的差异。

代谢组学作为生命科学领域的新的研究手段正在被广泛的应用到与疾病相关的代谢标志物的寻找方面^[15-17],通过代谢生物标记分子可以鉴定疾病的发生以及发展过程,还可以更快速、准确的诊断疾病。在代谢组学研究中,性别因素对体液代谢成分有一定的影响、体液代谢成分的变化也比较明显。综上所述,在代谢组学研究中要注意研究对象的性别对体内代谢的影响程度。

3 结论

本研究中,核磁共振测试作为一种无创伤性的

研究手段判别出了性别因素对大鼠体内代谢的影响程度。结果证明,不同性别大鼠尿液中的代谢成分有一定的差异,所以,在代谢组学研究中要充分考虑到性别因素在内的各种影响因素对体内代谢的影响程度,这在代谢组学研究过程中具有积极意义。

参考文献:

- [1] Nicholls A W, Holmes E, Lindon JC, *et al.* Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat[J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14 (8):975-987.
- [2] Lindon J C, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics: systems biology in pharmaceutical research and development[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6(3): 265-272.
- [3] Brindle J T, Antti H, Holmes E, *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H NMR based metabonomics[J]. *J Nat Med*, 2002, 8(12):1 439-1 444.
- [4] Brindle J T, Nicholson J K, Schofield P M, *et al.* Application of chemometrics to 1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension [J]. *Analyst*, 2003, 128(1):32-36.
- [5] 王全军,颜贤忠,吴纯启,等. Z24 经口染毒大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004,18(6):460-465.
- [6] Yongxia Yang, Chenglong Li, Xiu Nie, *et al.* Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis[J]. *Journal of Proteome Research* 2007, 6:2 605-2 614.
- [7] 巴吐尔·买买提明,哈木拉提·吾甫尔,豪富华. 异常黑胆质型与非异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学差异分析[J]. *科技导报*,2009,27(20):39-43.
- [8] 阿仙姑·哈斯木,马红,伊力亚尔·夏合丁,等. 新疆不同民族食管癌血浆代谢组学差异分析[J]. *中华预防医学杂志*,2009,7(43):591-596.
- [9] Kochhar S, Jacobs D M, Ramadan Z, *et al.* Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics[J]. *Anal Biochem*, 2006 (352): 274-281.
- [10] Lenz E M, Bright J, Wilson ID, *et al.* A 1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects [J]. *J Phar*

- Biomed Anal, 2003 (33):1 103 – 1 115.
- [11] Zuppi C, Messana I, Forni F, *et al.* ^1H – NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites[J]. Clin Chim Acta, 1997, 265: 85 – 97.
- [12] Holmes E, Foxall PJ, Nicholson JK, *et al.* Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ^1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states[J]. Anal Biochem, 1994, 220: 284 – 296.
- [13] Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith – Hall BM, *et al.* Biofluid ^1H NMR – based metabonomic techniques in nutrition research – metabolic effects of dietary isoflavones in humans[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16: 236 – 244.
- [14] Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Exacerbation of symptoms of fish – odour syndrome during menstruation [J]. Lancet, 1996, 348:1 740 – 1 741.
- [15] He Wen, Sung Soo Yoo, Jinho Kang, *et al.* A new NMR – based metabolomics approach for the diagnosis of biliary tract cancer [J]. Journal of Hepatology, 2010, 52(2):228 – 33.
- [16] Stefano T, Victor L, Ulrich L G. Early stage diagnosis of oral cancer using ^1H NMR – based metabonomics [J]. Neoplasia, 2009, 11(3): 269 – 276.
- [17] 艾斯克尔,哈木拉提·吾甫尔,豪富华,等. 基于 NMR 的维吾尔医异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学分析[J]. 科技导报, 2009, 27(13):27 – 31.

Metabonomic Analysis of Rat Urine Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

BATUR · Mamtimin^{1, 2}, MAMAT · Amat³, AYSHAMGUL · Hasim⁴, IBRAYIM · Ismayil¹

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. College of Pharmacy, Zhongnan University, Changsha 410007, China;

3. Institute For Drug Control, Kumul 839000, China;

4. Basic College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: The metabonomic groups of male and female rat urine have been investigated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Two pattern recognition techniques including the principal component analysis (PCA) and the orthogonal to partial least squares discriminant analysis (OPLS – DA) were used to find the difference of metabolic groups between male and female rats, respectively. The results of PCA and OPLS – DA analyses indicated that the amounts of valine, alanine, acetate, thiamine, ornithine, aminohippurate, phenylethylamine and cytosine in the urine samples of female rats were obviously higher than in those of male rats, based on the sufficient statistical variation ($p < 0.05$). On the other hand, the amounts of methylamine, dimethylamine, trimethylamine, creatinine, allantoin, fumarate, formate in the urine samples of male rats were higher than those of female rats ($p < 0.05$). The results showed that the gender of rat has certain effects on the metabolites of rat urine.

Key words: metabonomics; nuclear magnetic resonance; gender difference

Classifying number: O657.3

