

## 基于气相色谱质谱联用仪的糖尿病胃轻瘫大鼠血清代谢组学研究

冯小可<sup>1,2</sup>, 刘皓<sup>1,2</sup>, 冷秀梅<sup>1,2</sup>, 张前德<sup>2</sup>, 谢立群<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院中医科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学中西医结合研究所, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:分析2型糖尿病胃轻瘫组大鼠与正常组大鼠血清分子代谢物代谢轮廓的变化。方法:应用气相色谱和质谱联用仪方法,通过偏最小二乘法-判别分析方法(partial least squares linear discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析方法(orthogonal partial least squares linear discriminant analysis, OPLS-DA),鉴别糖尿病胃轻瘫组和正常组间血清小分子代谢物的区别。结果:两组血清的多种氨基酸成分有显著差异,与正常组比较,糖尿病胃轻瘫组苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸、肌酸及苯丙氨酸含量明显下降,尿酸含量明显上升。结论:甘氨酸、肌酸、苯丙氨酸等多种氨基酸含量的变化可能与糖尿病胃轻瘫的发病机制有关。

**[关键词]** 糖尿病胃轻瘫;代谢组学;气相色谱和质谱联用仪

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)06-793-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150607

## The high performance liquid chromatography study of serum from diabetic gastroparesis rats by gas chromatograph mass spectrometer equipment

Feng Xiaoke<sup>1,2</sup>, Liu Hao<sup>1,2</sup>, Leng Xiumei<sup>1,2</sup>, Zhang Qiande<sup>2</sup>, Xie Liqun<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Traditional Chinese Medicine Department, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Integrated Traditional and Western Medicine Institution, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the changes of serum molecule metabolites between rats with diabetic gastroparesis and healthy rats. **Methods:** Partial least squares linear discriminant analysis(PLS-DA) and orthogonal partial least squares linear discriminant analysis(OPLS-DA) were used to identify the differences of two groups on the basis of high performance liquid chromatography. **Results:** There were statistically significant differences in the amino acids between serum of the two groups, and compared with the normal control group, the contents of threonine, lactamine, aminoacetic acid, creatine and phenylalanine in the diabetic gastroparesis group were significantly decreased, however, the content of .trioxypurine was significantly increased. **Conclusion:** The results demonstrated that the different amino acids, which included glycocine/creatine/phenylalanine and so on, may be related to the pathogenesis of diabetic gastroparesis. Therefore, it has important forecasting significance to make use of gas chromatographic mass spectrometric analysis to study the pathogenesis of diabetic gastroparesis.

**[Key words]** diabetic gastroparesis; metabonomics; gas chromatographic mass spectrometric analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 793-797]

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一个严重危害人民健康的常见病和多发病,随着经济的发展和生活习惯的改变,其发病率在我国呈逐年增长趋势。治疗上由于胰岛素及相关制剂的应用已能较好地

控制血糖水平,但对于DM引起的一系列并发症,包括继发性肾病、骨病、神经病变及胃轻瘫等,目前尚缺乏有效干预手段,而正是这些并发症显著降低了患者的生活质量。糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是DM常见的慢性并发症之一,10年以上病程患者发生率达30%~50%,主要症状为餐后饱胀、恶心、呕吐、腹胀等,属于非机械梗阻性胃动力障碍,目前研究显示其主要与植物神经功能紊乱、血清胃肠激素异常、胃肠平滑肌改变、微血管病

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学基金面上项目(12KJB360002);第二批江苏省优秀中青年中医临床人才研修专项课题(YX1215)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xie-liqun@163.com

变等相关<sup>[1]</sup>,除吗丁啉等促进胃肠动力药外目前尚无长期有效的治疗方法。

DM及其并发症均表现为机体整体内分泌代谢紊乱,对其病理机制的研究通常从单个或几个大分子成分入手,而对整体代谢变化的研究困难较大。代谢组学是研究机体代谢产物谱变化的一种新的系统方法,通过测定生物体液,如血液、尿液、细胞提取物和组织提取液中所有分子量小于1 000的小分子代谢物组信息,揭示机体在内外多种因素的影响下整体代谢的变化规律,可从整体上全面分析疾病对生物系统的影响<sup>[2]</sup>。因此近年来利用代谢组学对DM的研究日益增多,主要集中在分析临床DM患者或DM动物模型的血清代谢组学变化特点<sup>[3-4]</sup>、DM肾病、骨病等并发症的代谢变化特点及相关药物干预机制<sup>[5-8]</sup>、以及不同药物治疗DM后的疗效评价等<sup>[9-10]</sup>,提示代谢组学对DM的诊断治疗,特别是对相关机制的研究具有重要提示作用。

本实验围绕DGP的代谢组学变化,采用气相色谱和质谱联用仪,将正常组和DGP组大鼠血清代谢产物进行比较研究,同时使用偏最小二乘法-判别分析方法(partial least squares linear discriminant analysis,PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析方法(orthogonal partial least squares linear discriminant analysis,OPLS-DA),以期准确发现两组间的差异性代谢物,探索代谢组学在DGP研究中的应用,并初步探讨DGP代谢物变化可能提示的相关发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF级SD雄性大鼠18只,体重(200±20)g,南京医科大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(苏2002-0031)],饲养于南京医科大学中西医结合研究所动物实验室。

GC色谱仪(Agilent 7890A,Agilent公司,美国);质谱仪(LECO Chroma TOF PEGASUS HT,LECO公司,美国);内标L-2-氯苯丙氨酸(CAS#:103616-89-3,上海恒柏生物科技有限公司);衍生化试剂BSTFA(含1%TMCS,REGIS Technologies公司,美国)。链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,BS038,Biosharp公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DGP模型建立

建立DM大鼠模型:SD大鼠购进适应性喂养7d后,随机分为正常对照组8只与DM组10只。DM组

大鼠用60 mg/kg STZ(溶于0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液,pH 4.5,10 mL/kg)单次腹腔注射,对照组用等容量枸橼酸盐缓冲液单次腹腔注射(剂量10 mL/kg)。3d后检测DM组大鼠空腹血糖(禁食12h以上),血糖 $\geq 16.7$  mmol/L,且能维持1周以上者,确定为DM大鼠模型,经检测最终成模8只。

DGP大鼠模型的建立:DM大鼠造模成功者给予高糖高脂饲料(普通饲料、熟猪油、蔗糖、奶粉、鸡蛋之比为58:15:20:5:2)不规则喂养,即采取单日上午和双日下午进食的办法。每2周测定体重、血糖、24h摄食量、饮水量1次,并观察其粪便量、性状、精神、活动情况等。喂养8周,检测血糖 $< 16.7$  mmol/L者剔除实验。DGP具备以下2种情况中任何一种则视为DGP模型建立成功:①在实验大鼠的监测过程中,大鼠日平均粪便重量和性状持续与对照组有明显差别;②实验结束时监测其胃肠推进指标,与正常对照组相比有显著差异。经检测血糖最终成模6只。

实验结束时因有大鼠死亡,最后存活正常对照组4只,DGP组5只。

#### 1.2.2 血液标本的收集

实验8周末采集正常对照组和DGP大鼠血样标本,保存在-80℃冰箱中。

#### 1.2.3 气相色谱和质谱联用仪(GC-MS)分析

代谢物萃取:取100  $\mu$ L血清样本,加入0.4 mL甲醇,再加入50  $\mu$ L L-2-氯苯丙氨酸,旋涡混匀;4℃12 000 r/min离心10 min;小心取出0.4 mL上清于2 mL甲烷硅基化的进样瓶中。

代谢物衍生化:在真空浓缩器中干燥提取物;向干燥后的代谢物加入80  $\mu$ L甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶20 mg/mL),轻轻混匀后,放入烘箱中37℃孵育2h;向每个样品中迅速加入100  $\mu$ L BSTFA(含有1%TCMS),将混合物70℃孵育1h;冷却至室温,向每组任一样本中加入10  $\mu$ L FAMES(饱和脂肪酸甲酯标准混合液,溶于氯仿C8-C16 1 mg/mL;C18-C30 0.5 mg/mL);混匀,上机检测。

上机检测:气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有Restek Rxi-5Sil MS毛细管柱(30 m $\times$ 250  $\mu$ m $\times$ 0.25  $\mu$ m,J&W Scientific公司,美国)。GC/TOFMS具体分析条件如下:进样量1  $\mu$ L,不分流模式;载气为氦气;前进样口吹扫流速3 mL/min;柱流速1 mL/min;柱温50℃保持1 min,以10℃每分钟的速率上升至330℃,保持5 min;前进样口温度280℃,传输线温度280℃,离子源温度220℃,电离电压-70 eV;扫描方式

85~600 m/z,扫描速率 20 spectra/s,溶剂延迟 366 s。

## 2 结果

### 2.1 数据预处理

对原始数据中缺失值进行模拟,数值模拟方法为最小值二分之一法进行填补;为了能够对下游数据进行更好分析,对数据进行过滤,目的是去除噪音数据;所用方法为:总数里面包含 80% 以上的空值数据;对过滤以后的数据进行标准化处理,方法是内标归一法。

### 2.2 主成分(PCA)分析

使用 SIMCA-P+ 软件(V13.0, Umetrics AB, Umea 公司, 瑞典)对归一化后的数据进行模式识别多变量分析,主成分分析使用 UV 格式化(unit variable scaling)处理的数据标度换算方式。对数据进行自动建模分析。

正常组与 DGP 组比较的 PCA 得分图(scores plot)如图 1 所示。样本大都处于 95% 置信区间内。从得分图可以看出, A 组与 B 组样品可以明显区分,通过后续的判别分析可以进一步研究其差异。

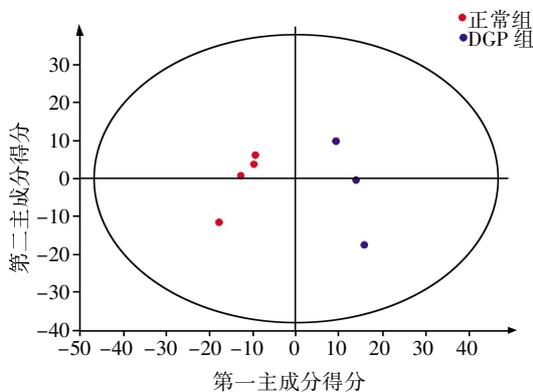


图 1 2 组的 PCA 得分图

Figure 1 PCA scores of the two groups

### 2.3 PLS-DA 及对模型的验证

使用 SIMCA-P+ 软件对归一化后的数据进行 PLS 发现数据(X 变量)和其他变量(Y 变量,分组信息)之间的相关关系。PLS-DA 使用 UV 格式化处理的数据标度换算方式,对第一、二主成分进行建模分析。PLS-DA 对模型的质量用 7 折交叉验证进行检验,并用交叉验证后得到的模型可解释的变量和模型的可预测度对模型有效性进行评判。在此之后,通过排列实验随机多次( $n=200$ )改变分类变量  $y$  的排列顺序得到相应不同的随机 Q2 值,对模型有效性做进一步的检验。

PLS-DA 得分图如图 2 所示(横坐标为第一主成分得分;纵坐标为第二主成分得分。 $R^2_X$ (即模型的可解释变量)及  $R^2_Y$ (即监督模型的解释率)接近 1 说明 PLS-DA 模型已经可以很好地解释两组样本之间的差异。置换检验截距  $R^2=0.683$ 、 $Q^2=-0.155$  可以很好体现模型的真实性和可靠性(图 3)。

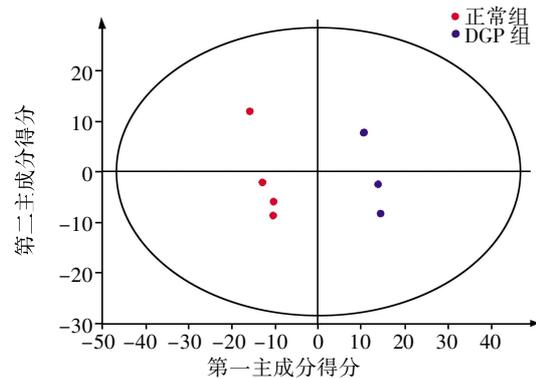
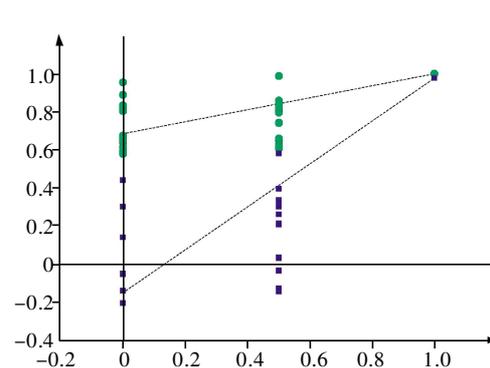


图 2 2 组的 PLS-DA 得分图

Figure 2 PLS-DA scores of the two groups



正常组与 DGP 组 PLS-DA 得分图 200 次置换检验的交叉验证结果。 $Q^2$  负值表明模型是可靠的,未存在过拟合现象。

图 3 2 组的 PLS-DA 置换检验图

Figure 3 The permutation test of PLS-DA of the two groups

### 2.4 OPLS-DA 分析

对 PLS-DA 模型进行正交矫正处理(OPLS-DA),使用 SIMCA-P+ 软件进行 OPLS-DA,最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异。OPLS-DA 使用 UV 格式化处理的数据标度换算方式,对第一、二主成分进行建模分析。A 组和 B 组比较的 OPLS-DA 的得分图如图 4。

### 2.5 差异代谢物的筛选及鉴定

通过 OPLS-DA 分析过滤了不相关的正交信号,因而获得的差异性代谢物更加可靠。本项目采用 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP (variable importance in the projection) 值(阈值 > 1),并结合  $t$  检验的  $P$  值(阈值 0.05)来寻找差异表达代谢物。表 1 显示根据原始参数建立的可能与 DM 相关的差异代谢物。

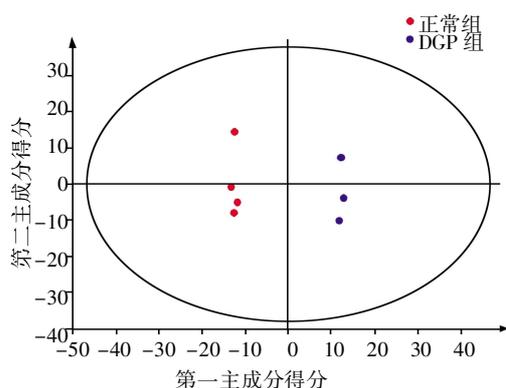


图4 2组的OPLS-DA得分图

Figure 4 The comparison of OPLS-DA scores by two groups

表1 正常大鼠组与DGP大鼠组血清差异性表达代谢物

Table 1 The differential expression of metabolites in serum of the NC group and DGP group

出峰时间	代谢产物	与正常组比较含量变化	VIP值	P值
7.788 6	丙氨酸	降低	1.546 08	0.000 13
10.674 9	甘氨酸	升高	1.355 19	0.019 41
10.972 5	柠檬酸	升高	1.298 28	0.018 48
11.726 1	苏氨酸	降低	1.236 89	0.033 82
13.850 4	肌酸	降低	1.146 03	0.049 65
14.720 2	苯丙氨酸	降低	1.328 97	0.013 76
19.558 1	尿酸	升高	1.472 40	0.001 45
20.879 0	硬脂酸	升高	1.514 28	0.001 59
25.080 3	槐糖	升高	1.458 97	0.002 62

表中为阈值VIP>1且P<0.05的差异物,有统计学意义。

### 3 讨论

代谢组学的概念早在1999年已被提出,目前已成为生命科学领域研究系统生物学的重要手段之一<sup>[11]</sup>。代谢组学技术通过测定生物体液,可揭示一系列关联生物标记物的综合差异,从整体上全面分析疾病对生物系统的影响,要比传统依赖单一标志物的方法具有更高准确性<sup>[12]</sup>。因此,以生物体液为研究对象的代谢组学技术目前已开始广泛应用在多种与代谢障碍密切相关的生命科学领域,其中DM相关血清代谢组学变化特点尤为热门,如应用气相色谱质谱分析发现,患者血清中赖氨酸、酪氨酸、缬氨酸通过影响胰岛素分泌及增强胰岛素抵抗成为与妊娠DM密切相关的独立因素<sup>[13]</sup>。对于DM重要并发症之一的DGP相关的代谢基础尚未涉及,本研究首次应用代谢组学对DGP发病的整体代谢改变进行研究,初步探讨了DGP可能的发病基础。

DGP是DM引起的植物神经功能紊乱,可能与DM自主神经病变导致传入神经通路敏感性降低有

关,严重者出现反流性食管炎,还可引起小肠和结肠排空异常,出现腹痛、便秘或腹泻等症状<sup>[14]</sup>。本研究结果发现,DGP组大鼠与正常对照组大鼠血清的代谢谱有明显差异,两组间的代谢谱轮廓可以清晰地地区分开,说明DGP大鼠的正常新陈代谢已被明显打乱,两组血清代谢物经过PLS-DA的代谢模式比较,分析出差异常变量,提示代谢谱中包含更多DGP病理变化信息。从代谢差异性化合物的鉴定结果可以看出,相较正常组大鼠血清,DGP大鼠血清苏氨酸、丙氨酸等成糖氨基酸含量下降明显,这符合DM的基本病理机制:胰岛素分泌不足和糖异生增强,各种成糖氨基酸为补充糖异生被大量消耗,故血中的成糖氨基酸含量下降<sup>[15]</sup>,更重要的是,本实验结果还发现DGP大鼠血清中与神经调节密切相关的甘氨酸、与肾上腺和甲状腺功能密切相关的苯丙氨酸等的含量较正常组也明显下降。

甘氨酸是结构最简单的一种人体非必需氨基酸,是肽和蛋白质的构建分子,是组织、器官和细胞的保护剂,目前研究显示其为一种重要的神经递质<sup>[16]</sup>,与DM有关的作用研究甚少。有研究显示,甘氨酸对果糖膳食诱导的肠源性内毒素血症具有改善作用,可能通过抑制脂肪组织NF-κB和促炎因子的表达改善2型糖尿病相关症状<sup>[17]</sup>。因甘氨酸同时具有抑制和兴奋作用,其对神经传递信息及胃平滑肌的节律性运动亦有重要调节作用。本研究中DGP组大鼠血清甘氨酸的含量较正常组明显下降,提示DM机体可能因某种原因失去甘氨酸的保护作用,或甘氨酸的平衡功能失调从而导致胃平滑肌节律性运动失控,提示甘氨酸在DGP的发病机制中可能存在重要作用。

肌酸是存在于动物体内的一种含氮有机酸,能够为肌肉和神经细胞提供能量。已有实验证实补充外源性肌酸能改善DM的胰岛激素代谢紊乱<sup>[18]</sup>。而DGP组中血清肌酸含量下降,提示可能与其导致的糖原合成能力和肌肉细胞运动能力下降有关,进而影响调节消化的神经功能及胃平滑肌细胞的运动。

尿酸是人体嘌呤核苷酸氧化分解代谢的终产物,有研究显示尿酸升高与DM发病率密切相关<sup>[19]</sup>;亦有研究显示2型糖尿病患者因高胰岛素血症使尿酸重吸收增加,促使痛风、冠心病等相关代谢并发症发病率升高<sup>[20]</sup>;因此尿酸既是DM发生的启动因素,也是DM的必然结果之一。虽然有实验证实尿酸作为一种强氧化物,能清扫过氧化物和氧自由基,对神经细胞和阿尔茨海默症等神经疾病具有保护作

用<sup>[21]</sup>,但本实验结果证实 DGP 模型组较正常组血清尿酸升高,其相关机制值得进一步研究。

苯丙氨酸是  $\alpha$ -氨基酸的一种,是人体必需氨基酸之一,是生产肾上腺素和甲状腺素的原料,对神经元的生理调节过程具有重要作用<sup>[22]</sup>,其可通过 caspase-3 诱导神经细胞的生理性死亡<sup>[23]</sup>。相关研究显示病理状态下过多的苯丙酮酸可导致智力发育障碍<sup>[24]</sup>,而本实验结果显示 DGP 组血清中的苯丙氨酸含量明显低于正常组,提示其对相关神经的调节作用缺失可能是造成胃肠神经功能紊乱的重要原因之一。

综上所述,本研究利用气相色谱质谱分析的代谢组学方法发现了 DGP 的代谢物特征,对诊断 DGP 或评价其疗效的相关标示物的发现具有重要意义,为临床早期诊断及治疗 DGP 提供了新的研究思路。本文总结的代谢物只是本研究差异性化合物中的一部分,更多的产物可能与 DGP 相关,有待相关实验进一步证实,并深入研究可能存在的机制。

#### [参考文献]

[1] Camilleri M, Bharucha AE, Farrugia G. Epidemiology, mechanisms, and management of diabetic gastroparesis [J]. *J Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9(1): 5-12

[2] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with the metabolomics? [J]. *J Anal Chem*, 2003, 75(17): 384A-391A

[3] 肖继, 张磊, 马明坤, 等. 糖代谢异常人群血清代谢组学研究[J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(12): 909-911

[4] 黄建华. 2 型糖尿病相关的代谢组学和生物信息学研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014

[5] 皮子凤, 门丽慧, 张静, 等. 五味子治疗大鼠糖尿病肾病作用机制的血清代谢组学研究[J]. *分析化学*, 2015, 43(2): 168-175

[6] 梁琼麟, 罗国安, 王义明. 基于色谱-质谱联用的糖尿病肾病临床代谢组学研究[C]. 中国化学会首届全国质谱分析学术研讨会, 2014

[7] 熊莉华, 梁伟东, 叶瑞妍, 等. 双黄益骨方治疗糖尿病骨代谢疾病的代谢组学研究[J]. *中药导报*, 2014, 20(10): 18-21

[8] 梁伟东. 从代谢组学分析糖尿病性骨质疏松病机与中药干预机理[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014

[9] 范雪梅, 王李黎, 王义明, 等. 基于代谢组学的复方罗格列酮配伍减毒评价研究[C]. 北京: 中国化学会首届全国质谱分析学术研讨会, 2014

[10] 王静, 袁子民, 李云兴, 等. 基于 GC-MC 代谢组学研究黄连、生地黄治疗 2 型糖尿病的配伍机制[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3): 526-529

[11] Tang HR, Wang YL. Metabonomics: a revolution in progress [J]. *J Prog Biochem Biophys*, 2006, 22(5): 401-417

[12] Dettmer K, ARonov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics [J]. *J Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(5): 51-78

[13] Park S, Park JY, Lee JH, et al. Plasma levels of lysine, tyrosine, and valine during pregnancy are independent risk factors of insulin resistance and gestational diabetes [J]. *J Metab Syndr Relat Disord*, 2015, 13(2): 64-70

[14] 薛瑶. 糖尿病胃轻瘫的诊治进展[J]. *重庆医学*, 2013, 42(25): 3054

[15] 王凤. 血清氨基酸浓度与糖尿病的相关性分析[D]. 镇江: 江苏大学, 2013

[16] 周鸿铭, 雷娜, 鲁亚平. 甘氨酸神经递质研究进展[J]. *生物学杂志*, 2011, 28(1): 79-81

[17] 任云峰, 宋彬好, 姚心琪, 等. 甘氨酸保护果糖饮食诱导大鼠糖尿病机制的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(4): 368-370

[18] 吴昊, 冯美云. 补充肌酸对糖尿病大鼠代谢的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2011, 24(3): 323-325

[19] 冯佩. 血清中尿酸水平与糖前期及糖尿病的关系研究[J]. 苏州: 苏州大学, 2013

[20] 刘志勇, 陈闽荔, 吕建国, 等. 2 型糖尿病患者血清总胆红素、尿酸与冠脉病变的关系[J]. *天津医药*, 2008, 3(63): 171-172

[21] 张宁, 张琪林, 罗蔚锋. 尿酸保护多巴胺能神经元的分子机制研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2004, 13(6): 635-636

[22] 张拥军, 袁小兵, 顾学范. 脑源性神经生长因子抑制苯丙氨酸诱导的神经元凋亡[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(12): 1068-1069

[23] 黄丽素. 高苯丙氨酸介导的 cAMP 信号通路对神经元生长的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2009

[24] 邱文娟, 潘骏, 顾学范. 苯丙氨酸及其代谢物影响 P19 细胞神经分化的形态学研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2002, 18(2): 118-120

[收稿日期] 2015-01-19