

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00565

肾虚证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究

高 岗, 杨根金, 娄子洋*

第二军医大学药学院药物分析测试中心, 上海 200433

[摘要] **目的:**应用¹H NMR结合主成分分析(PCA)方法研究氢化可的松诱导的肾虚证大鼠和空白对照大鼠的尿液成分谱差异。**方法:**使用氢化可的松诱导大鼠建立肾虚证模型,¹H NMR分析对照组和模型组大鼠的尿液,使用PCA方法进行模式识别,寻找标记物并做出相关代谢途径的可能解释。**结果:**PCA方法处理肾虚证和空白对照大鼠尿液数据显示,两组大鼠的数据可以在得分图实现分类,与对照组比较肾虚组大鼠由于氢化可的松诱导,大鼠机体进入一个过消耗后衰弱的状态,相关代谢发生显著变化,乳酸(δ 1.37)代谢发生堆积;二甲胺(δ 2.72)的含量增加,提示肾虚与肾功能异常是密切相关的;天冬氨酸(δ 2.83),牛磺酸(δ 3.44, 3.28),马尿酸(δ 7.84, 7.56, 7.64, 3.97),肌氨酸(δ 3.87)等的相对积分面积明显下降,这预示糖皮质激素可能引起了肾上腺皮质分泌功能的损害;琥珀酸(δ 2.41)和柠檬酸(δ 2.53, 2.68)是三羧酸循环能量代谢及糖酵解的中间产物,其含量的降低,通常是由于线粒体功能紊乱所引起。**结论:**¹H NMR结合PCA模式识别的代谢组学方法具有研究复杂条件下机体病理生理变化的优势,本研究为理解中医的肾虚证和为该疾病临床诊治的研究提供了证据。

[关键词] 代谢组学;磁共振波谱学;主成分分析;肾虚证;尿

[中图分类号] R 256.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0565-04

Metabonomic study on urine of rats with hydrocortisone-induced kidney deficiency syndrome

GAO Gang, YANG Gen-jin, LOU Zi-yang*

Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To apply ¹H NMR spectroscopic analysis and principal components analysis (PCA) for investigating the fluctuation of metabolites between hydrocortisone-induced kidney deficiency syndrome (Shenxu Zheng) rats and the normal rats. **Methods:** Using ¹H NMR based metabolic profiling and PCA, we investigated the difference of urine metabolites between the normal rats and rats with hydrocortisone-induced kidney deficiency syndrome. We also explained the changes of the related metabolic pathway or metabolic network. **Results:** The changes following hydrocortisone intervention of rats could be identified by PCA, and the kidney deficiency syndrome rats entered a state of “hyperfunction”, involving a series of changes in metabolic pathway and metabolic network. The response integral area of lactic acid (δ 1.37) increased, indicating the accumulation of metabolites of lactic acid. The amount of dimethylamine (δ 2.72) also increased, indicating that the disorder of kidney function was related to kidney-deficiency syndrome. The response of creatinine (δ 3.87), asparaginic acid (δ 2.83), taurine (δ 3.44, 3.28), and hippurate (δ 7.84, 7.56, 7.64, 3.97) all decreased significantly, indicating that the hydrocortisone might cause adrenal cortex excretion injury. The response integral area of succinate (δ 2.41) and citric acid (δ 2.53, 2.68) decreased, which was usually caused by disorder of the mitochondrial function. **Conclusion:** It is suggested that the metabonomic approach can be used to investigate the pathophysiological changes under certain physiopathologic conditions. This study provides evidence for understanding “Shenxu Zheng” (kidney deficiency syndrome) in traditional Chinese medicine and for diagnosis and therapy of such diseases.

[KEY WORDS] metabonomic; magnetic resonance spectroscopy; principal components analysis; kidney deficiency syndrome; urine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 29(5): 565-568]

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,其作为后基因组时代的一种全新的组学技术,以生物体内低相对分子质量物质的动态规律变化来表征生物

体的生理病理变化趋势,最终通过还原相关联的生物事件来揭示生物体的病理生理变化实质和机制^[1]。核磁共振(NMR)分析方法作为当前代谢组

[收稿日期] 2008-10-20 **[接受日期]** 2009-03-10

[作者简介] 高 岗, 硕士生. E-mail: frankgaogang@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com

学研究中的主要技术之一,优势非常明显。NMR能对样品实现非破坏性、非选择性的分析,可在接近生理条件下进行实验,可设计多种编辑手段,实验方法灵活多样。此外,NMR分析没有偏向性,对所有化合物的灵敏度是一样的。NMR氢谱的谱峰与样品中各化合物的氢原子一一对应,所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。因此,NMR方法很适合研究代谢产物中的复杂成分^[2]。

以代谢组学为基础的系统生物学的发展与未来医药学有着密切的联系。中医的“证”是机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括,它很可能是人体调控网络功能发生变化后的一种特异性并具有相对稳定性的状态。从代谢组学的观点而言,人体处于不同的生理病理状态时必然存在特定的代谢组分模式^[3]。代谢组分所反映的是人体生化网络对所有扰动因素进行应答和变化的终端信息,可能更接近于中医“证”的内涵。代谢组学研究的兴起,为揭开“证”的面纱提供了契机^[4]。中医认为肾为“先天之本,后天之根”,在人的生长、发育、壮盛和衰老的生命全过程中具有举足轻重的作用^[5]。对于肾虚证进行代谢组学研究,将有助于深入对肾虚证本质的认识,有助于更好的预防和治疗该类疾病。

1 材料和方法

1.1 实验动物 12只健康Wistar大鼠,雄性,体质量200~220g,SPF级,由中国科学院上海实验动物中心提供,室温为25℃。动物置于代谢笼中,自由摄食饮水。

1.2 主要试剂和仪器 重水(D₂O)为美国CIL公司产品,2,2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸(3-trimethylsilyl-[2,2,3,3-D₄]-propionate, TSP)为美国Aldrich公司产品。氢化可的松注射液(批号:20071010)购自上海信谊制药厂。AVANCE II 600 MHz型超导傅立叶变换NMR谱仪,为瑞士BRUKER公司产品。

1.3 造模方法和样品收集 大鼠分为2组:模型组($n=7$)和对照组($n=5$)。在笼中适应2周后,大鼠单只单笼转移到代谢笼中,在代谢笼中适应48h。实验全过程中动物环境保持如下条件:12h光照,12h黑暗,温度20~22℃,湿度控制在45%~65%。模型组每天按照1.5mg/100g(氢化可的松/大鼠体质量)腹腔注射氢化可的松,对照组注射等量的生理

盐水。持续10d,第10天时,收集24h尿液(内加100μl浓度为1mmol/L的叠氮钠作为防腐剂)并置于冰中保持低温,收集完后立即放入-20℃冰箱保存。造模过程中大鼠表现出体质量减轻、活动性减少、反应变慢、食欲降低和体毛稀疏等症状^[6]。

1.4 尿液处理 尿液样品以3000×g离心10min以除去固体杂质,取上清液按体积比(V/V)1:2加入磷酸盐缓冲液(0.2mol/L Na₂HPO₄-0.2mol/L NaH₂PO₄),静置10min。再于同样条件下13000×g离心10min,取上清液,加入适量D₂O和TSP,取上层清液550μl置于5mm核磁管中,使用AVANCE II 600 MHz型超导傅立叶变换NMR谱仪进行测量^[7]。

1.5 NMR数据采集和处理 在超导傅立叶变换NMR谱仪上调用cpmgpr1d脉冲序列,该序列可以较好地去除尿液中大分子的干扰。相关参数如下:预饱和时间2s,谱宽7288.63Hz,采样点数64k,采样时间2.6s,叠加次数128次,循环次数128次,并控制温度在298.2K。自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过32k傅立叶变换转为NMR谱图。以TSP为化学位移参考峰的位置,设为0,校正化学位移,对图谱进行相位校正和基线校正,将图谱文件夹导入本实验室自编的Matlab软件进行处理,将¹H谱按默认值,从10.0到0.2,扣除水峰等活性氢所在的区域δ4.2~6.0,以避免溶剂峰对谱图的影响,然后以每段为0.04进行分段并积分,共获得200个化学位移小段和各化学位移对应的积分值。将积分值进行中心化和比例换算后,以文本文件或Excel文件贮存,用于主成分分析(principal components analysis, PCA)。

1.6 主成分分析 将预处理后的数据导入Simca-P 11.5(Umetrics AB, Umea, Sweden)^[8]软件,求出主成分(principal components, PC),得出得分图(score plot)和载荷图(loading plot),实现尿样样品的分类;同时得出对分类贡献较大的变量,利用PCA结果对各组大鼠尿液的代谢组变化进行解释。

2 结果

2.1 大鼠尿液氢谱 模型组和空白组大鼠尿液的典型¹H NMR谱如图1所示。

2.2 代谢物成分的指认 检索代谢组学相关¹H NMR化学位移谱库(HMDB, KEGG, LIPID-

MAPS, COLMAR Metabolomics Web Portal, NMR Shift DB 等), 并同时参考文献^[1,9]对正常大鼠尿液中的部分成分化合物进行指认, 结果见图 2。在空白组大鼠尿液的¹H NMR 谱中可以发现很多内源性的代谢产物, 如氨基酸和脂肪酸。这些物质存在于多个生化过程中, 比如能量代谢、脂类代谢和氨基酸代谢, 所以其氢谱图可以作为化学指纹谱用来描述氢化可的松诱导的大鼠内源代谢产物的变化。对于未能指认化学位移所对应的化合物, 尚需要其他的手段进一步鉴别。

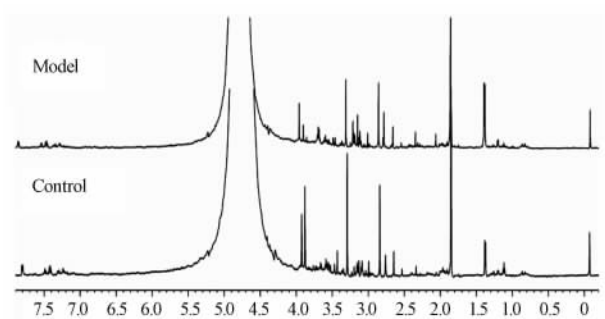


图 1 600 MHz ¹H NMR 大鼠尿液图谱
Fig 1 600 MHz ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) urine spectra

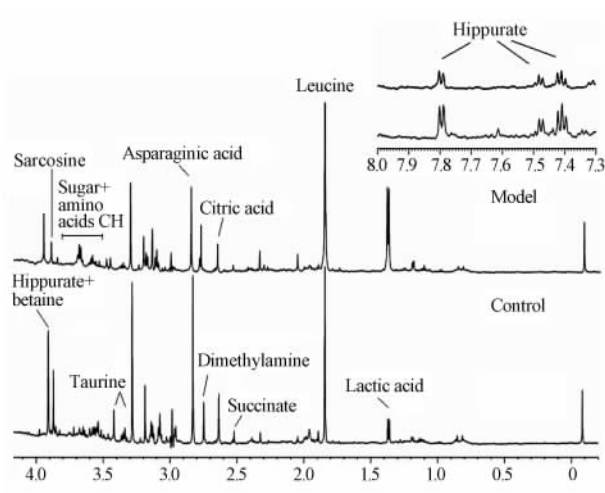


图 2 模型组样品和空白组样品大鼠尿液中部分化合物鉴别
Fig 2 Identification of metabolites in control urine sample and model rat urine sample

2.3 PCA 结果 对 12 只大鼠尿液氢谱积分值的 PCA 结果见图 3。由图 3 可知, 主成分积分值集中分布于椭圆形的三点图(95%置信区间内)的 2 个区域, 模型组和空白组之间无交叉和重叠, 对氢谱变化影响最大的 2 个主成分的贡献率分别是 41%(PC1)和 22%(PC2)。

2.4 标记物的寻找 通过 PCA 的载荷图(图 4), 确定对分类贡献较大的变量。每一个变量对应于特定的化学位移, 通过归属化学位移, 确定标记化合物。对于大鼠尿液 NMR 数据中发生变化的成分, 将其化学位移和对应的化合物, 化合物变化的方向列于表 1, 推测出大鼠可能的肾虚证标记物。

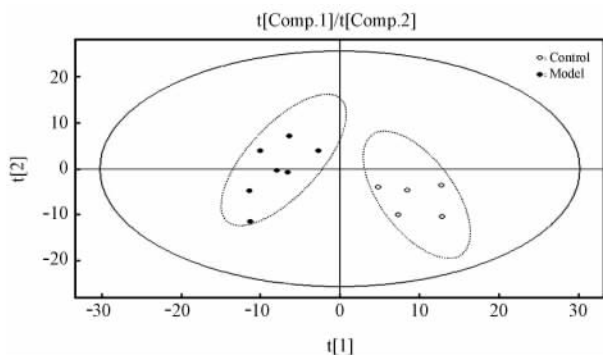


图 3 空白组和模型组尿样样品的散点分布图 (t[Comp. 1]/t[Comp. 2])

Fig 3 Score scattering plot (t[Comp. 1]/t[Comp. 2]) of control urine sample and model urine sample following PCA

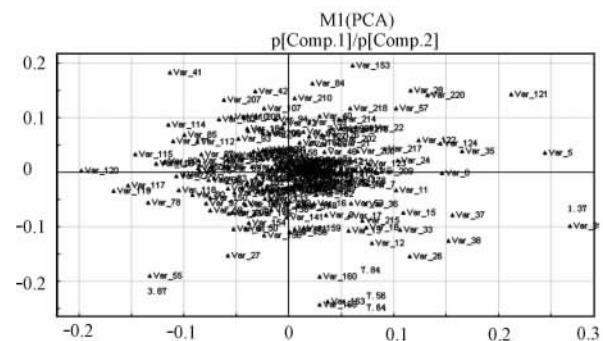


图 4 主成分分析空白组和模型组尿样样品载荷图 (t[Comp. 1]/t[Comp. 2])

Fig 4 Loading plot (t[Comp. 1]/t[Comp. 2]) for control urine sample and model urine sample following PCA

表 1 大鼠尿液中部分成分的变化

Tab 1 Changes of urine metabolites in model rats

Compounds	δ_H	Changing direction
Creatinine	3. 87	↓
Dimethylamine	2. 72	↑
Asparaginic acid	2. 83	↓
Taurine	3. 44, 3. 28	↓
Hippurate	7. 84, 7. 56, 7. 64, 3. 97	↓
Succinate	2. 41	↓
Citric acid	2. 53, 2. 68	↓
Lactic acid	1. 37	↑

“↑” Indicate up-regulation of metabolites concentration in rat urine; “↓” Indicate down-regulation of metabolites concentration in rat urine

3 讨论

大鼠尿液的¹H NMR谱PCA表明,模型组和对照组在积分值散点图中呈聚类分布,两组未见重叠,对PC1和PC2进一步分析,与空白组相比,由于氢化可的松的干预,其中乳酸(δ 1.37)的量显著增加。乳酸是丙酮酸和氢结合后生成,如果大鼠机体的能量代谢正常进行,不会产生堆积,将被血液带至肝脏,进一步分解为水和二氧化碳并产生热量,其响应积分面积的增加显示模型组大鼠的乳酸代谢发生了堆积,推测可能是由于氢化可的松诱导引起大鼠机体能量代谢发生紊乱所致。模型组大鼠尿液二甲胺(δ 2.72)的含量增高,提示肾虚与肾功能异常密切相关。而天冬氨酸(δ 2.83),牛磺酸(δ 3.44,3.28),马尿酸(δ 7.84,7.56,7.64,3.97),肌氨酸(δ 3.87)等的相对积分面积则明显下降,预示着糖皮质激素可能引起了肾上腺皮质分泌功能的损害。琥珀酸(δ 2.41)和柠檬酸(δ 2.53,2.68)是三羧酸循环能量代谢及糖酵解的中间产物,其含量的降低,通常是由于线粒体功能紊乱引起。有文献^[10]报道在实验中大鼠的腺体、脑垂体、肾上腺和胸腺的质量在外部糖皮质激素(氢化可的松)干预后减轻,推测可能是由于药物诱导的动物免疫系统的“过消耗”。大鼠尿液中的代谢产物变化显示机体的代谢活性由于氢化可的松的干预而呈现广泛显著性增强,即在高剂量氢化可的松的干扰之后,动物进入了一个“功能亢进”状态^[11],包括代谢网络中一系列的改变,比如活化了下丘脑单胺递质并且加速了能量代谢。能量和免疫系统的“过消耗”最后导致大鼠进入“耗竭”状态,大鼠机体内部的代谢表现出迟缓和衰弱现象,外部则有如下特点:活动减少,食欲降低,质量减轻,体毛稀疏等^[11]。

本研究应用NMR和多变量统计分析技术方法研究大鼠的肾虚证模型,通过对高剂量氢化可的松诱导的大鼠模型尿液的分析和模式识别,显示该方法能够区分空白组大鼠和肾虚组大鼠尿液样品,同时进行了标记物寻找和解释。尽管在空白组和模型组各自组内,大鼠个体间的尿液成分存在差异,但是这些生化差异经PCA处理后可以实现分类聚类,这也体现模式识别在代谢组学研究中的重要意义。本

工作有利于深入认识和理解中医肾虚证的本质,同时为该类疾病的临床诊断和治疗研究提供依据。

综上所述说明尿液代谢组学分析能够较好地反映肾虚证的代谢特征。说明基于NMR结合模式识别的代谢组学方法是一个可用于研究复杂条件下机体病理生理状态变化,从而揭示代谢相关疾病本质的强有力工具。

[参考文献]

- [1] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli *via* multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29: 1181-1189.
- [2] 颜贤忠,赵剑宇,彭双清,廖明阳. 代谢组学在后基因组时代的作用[J]. *波谱学杂志*, 2004, 21: 263-271.
- [3] 周明眉,刘平,贾伟,赵爱华,邱明丰,邱云平,等. 基于代谢网络变化的中药整体效应评价方法研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2006, 8: 113-119.
- [4] 贾伟,蒋健,刘平,赵立平,陈闯军,周明眉,等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31: 621-624.
- [5] 张云飞,文秀华,罗茂林. 肾虚本质的现代研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2004, 13: 1101-1103.
- [6] Li F, Lu X, Liu H, Liu M, Xiong Z. A pharmaco-metabonomic study on the therapeutic basis and metabolic effects of *Epimedium brevicornum* Maxim. on hydrocortisone-induced rat using UPLC-MS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 397-405.
- [7] 王全军,颜贤忠,吴纯启,赵剑宇,盛和章,余寿忠,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: 460-465.
- [8] Wold S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models[J]. *Pattern Recognition*, 1976, 8: 127-139.
- [9] Bollard M E, Stanley E G, Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition[J]. *NMR Biomed*, 2005, 18: 143-162.
- [10] 蔡定芳,陈晓红,刘彦芳,张玲娟,沈自尹. 外源性糖皮质激素对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 13: 589-592.
- [11] Chen M, Zhao L, Jia W. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model[J]. *J Proteome Res*, 2005, 4: 2391-2396.

[本文编辑] 尹茶