

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00288

## 基于核磁共振波谱的乙肝患者血清代谢组研究

杨永霞<sup>1</sup>, 杨生义<sup>2</sup>, 梁敏锋<sup>3</sup>, 丘翠环<sup>1</sup>

1. 广东药学院基础学院物理与电子学教研室, 广州 510006
2. 兰州大学第一临床医院消化科, 兰州 730000
3. 南方医科大学南方医院感染内科, 广州 510515

**[摘要]** **目的** 应用核磁共振氢谱(nuclear magnetic resonance <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H NMR)和主成分分析方法研究慢性乙肝患者血清的代谢组变化。**方法** 临床正常人血清 8 例和慢性乙肝患者血清 20 例, 采用 BRUKER 500 MHz 超导核磁共振波谱仪进行检测, 并运用 PCA 分析方法, 得出慢性乙肝患者血清代谢组的特征, 探讨相关生化过程的改变。**结果** 分析结果显示慢性乙肝患者和正常人血清的代谢组具有明显差异。乙肝患者血清中的脂和葡萄糖是升高的, 而乳酸、丙氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺以及胆碱类物质则是降低的, 且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 通过上述代谢物的变化可以区分正常人和慢性乙肝患者。这种基于核磁共振氢谱和主成分分析的代谢组学方法可以为乙肝的诊断提供可靠的分子水平上的代谢依据。

**[关键词]** 核磁共振氢谱; 乙型肝炎; 代谢; 主成分分析

**[中图分类号]** R 512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0288-04

### <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with principal component analysis for metabonomic study on serum of HBV patients

YANG Yong-xia<sup>1</sup>, YANG Sheng-yi<sup>2</sup>, LIANG Min-feng<sup>3</sup>, QIU Cui-huan<sup>1</sup>

1. Department of Physics and Electronic Teaching, Basic School of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China
2. Department of Gastroenterology and Hepatology, First Clinical Medicine College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China
3. Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To characterize the metabolite composition (i. e. , metabonome) of the serum samples from chronic hepatitis B patients by using nuclear magnetic resonance <sup>1</sup>H (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy combined with principal component analysis (PCA). **Methods** The <sup>1</sup>H NMR spectra were obtained for the serum samples from 8 healthy controls and 20 chronic hepatitis B patients, and the spectra data were analyzed by PCA to demonstrate the metabonomic changes. **Results** We found that there were evident differences in metabonomics between the healthy controls and chronic hepatitis B patients. The levels of lipids and glucose were significantly increased in the chronic hepatitis B patient and the levels of lactate, alanine, valine, glutamine and phosphocholine/choline were significantly decreased compared with the healthy controls ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Our results indicate that the metabonomes of serum from chronic hepatitis B patients are different from those of the healthy controls. Serum <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with PCA may offer reliable biochemistry evidence for diagnosis of chronic hepatitis B at molecular level.

**[Key words]** proton nuclear magnetic resonance; hepatitis B; metabolism; principal component analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):288-291]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在全球广泛分布, 慢性乙型肝炎是导致肝硬化、肝功能衰竭和原发性肝癌的主要危险因素。我国是 HBV 感染的高流行区, 大约有 1 亿 2 千万的 HBV 携带者, 基本上占我国总人口的 9.09%, 因此 HBV 感染已经成为严重威胁人类身体健康的重要病原体之

一。Yin 等<sup>[1]</sup>采用色谱-质谱联用技术研究了乙肝引起的肝硬化和肝癌患者血清的代谢组变化。高分辨核磁共振<sup>1</sup>H 谱(nuclear magnetic resonance <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H NMR)是研究生物样品(如生物组织/尿液/血液/组织提取液等)代谢组变化的一种很重要的手段, 而且这种方法具有良好的客观性和可重复性, 无需对

**[收稿日期]** 2009-11-02 **[接受日期]** 2010-01-03

**[作者简介]** 杨永霞, 博士, 讲师. E-mail: sheepling-2004@163.com

样品进行特殊处理,可以实现对整个代谢组的同步检测。由于以上这些优点,近年来基于核磁共振的代谢组学方法已经被广泛地用来研究肝毒性<sup>[2-3]</sup>、肾病<sup>[4]</sup>及眼眶肿瘤<sup>[5]</sup>等疾病。2006年 Martínez-Grados 等<sup>[6]</sup>报道了对人体穿刺所得的肝炎和肝硬化组织的代谢研究。本实验应用高分辨核磁共振<sup>1</sup>H 谱和主成分分析方法研究慢性乙肝患者血清的代谢组特征,找出与乙肝病毒感染有关的标志性代谢物,为乙肝的诊断提供可靠的分子水平上的代谢依据。

## 1 材料和方法

1.1 样品收集 于南方医科大学南方医院感染内科收集临床患者血清样本 28 例,其中包括正常人血清 8 例和慢性乙肝患者血清 20 例,并置 -80℃ 冰箱贮存备用。该实验得到南方医科大学南方医院伦理委员会的批准,并经得被采血者和患者的同意。

1.2 样品预处理 <sup>1</sup>H NMR 谱采样前,将所有血清样本解冻,在 4℃ 下,10 000×g 离心 10 min。取 300 μl 上层血清加至 5 mm NMR 测试管中,后加入 200 μl 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4)和 50 μl 重水,振荡混匀。

1.3 NMR 实验 NMR 实验采用 BRUKER 500 MHz 超导核磁共振波谱仪,实验温度为 298 K。采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG, relaxation delay-90-(τ-180-τ)<sub>n</sub>-acquisition) 脉冲序列,总的回波时间 2 nτ=100 ms,4 s 的延迟时间,10 kHz 谱宽,64 k 数据点,采集次数为 128。傅立叶变化前加 0.3 Hz 指数窗函数处理,采用 TOPSPIN 2.0 软件进行手动调相和基线校正,化学位移以乳酸甲基双重峰 1.33 进行定标。

1.4 NMR <sup>1</sup>H 谱的数据预处理和主成分分析 采用软件 TOPSPIN 2.0 对所有 <sup>1</sup>H CPMG 谱进行自动积分,积分区间 0.5~9.0,积分间隔 0.02。为了消除剩余水峰引起的影响,将积分区间 4.7~5.2 的积分值设为零。此外,为了消除样本间因浓度不同而带来的分析误差,在进行主成分分析之前对各分段积分值进行归一化处理。归一化后的数值将作为原始数据导入软件 Simca-P 10.0 (Umetrics, Sweden) 中进行模式识别主成分分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS (Version 13.0, SPSS Inc., USA) 软件对正常人和慢性乙肝患者血清代谢物的归一化积分值进行 *t* 检验, *P*<0.05 被认为具有统计学差异。

## 2 结果

2.1 正常人和乙肝患者血清的 <sup>1</sup>H NMR 谱代谢物成分及比较 应用 T<sub>2</sub> 滤波的 CPMG 序列,图 1 可明显观察到异亮氨酸(isoleucine, 0.93),缬氨酸(valine, 0.99, 1.04),乳酸(lactate, 1.33, 4.12),丙氨酸(alanine, 1.48),N-乙酰糖蛋白(N-acetylglycoproteins, NAC, 2.04),甲硫氨酸(methionine, 2.13),乙酰乙酸(acetoacetate, 2.22),丙酮酸(pyruvate, 2.37),谷氨酰胺(glutamine, 2.41),肌酸(creatine, 3.03),磷酸胆碱/胆碱(phosphocholine/choline, 3.22),氧化三甲胺(TMAO, 3.27)、葡萄糖(α-glucose 和 β-glucose, 3.40~3.90, 4.66, 5.22),且谱峰重叠大大降低,减小了由于谱峰重叠带来的分析误差。观察正常人(图 1A)与乙肝患者(图 1B)血清 <sup>1</sup>H CPMG 谱,可以发现代谢物乳酸和胆碱类物质的含量在乙肝患者血清中是降低的,而脂类物质则升高。

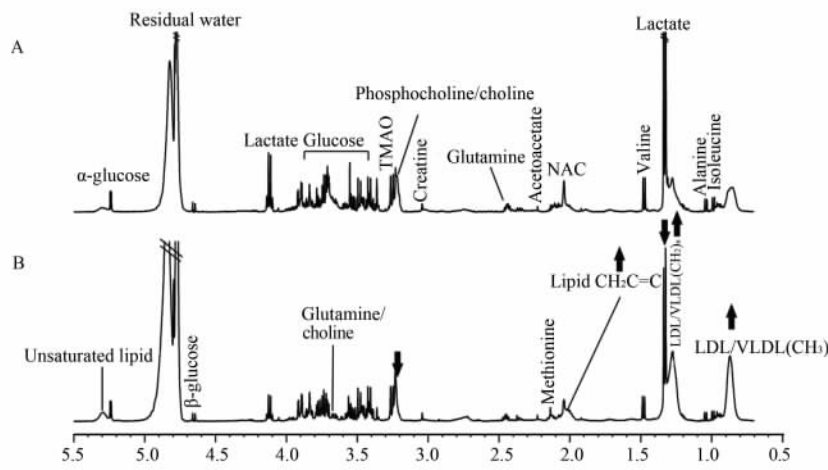


图 1 正常人(A)与慢性乙肝患者(B)<sup>1</sup>H CPMG 谱

Fig 1 Representative <sup>1</sup>H CPMG spectra of serum from healthy human (A) and chronic hepatitis B patients (B)

Arrows suggest the metabonomic changes in chronic hepatitis B patients. ↑: Increase; ↓: Decrease

2.2 PCA分析 由于一张<sup>1</sup>H NMR谱中有很多代谢物信号峰,且代谢物之间存在着一定的联系,所以仅仅凭借肉眼很难全部观察到这些代谢物的变化。基于多变量的主成分(PCA)分析方法,是通过原始谱图进行降维,然后对所有样本进行分析,能够给出不同类型样本间的代谢差异。图2给出对正常人和慢性乙肝患者血清<sup>1</sup>H CPMG谱的主成分分析结果(PC1 vs PC2, R<sup>2</sup> = 75.8%),分析结果以得分图(score plot)和负载图(loading plot)给出,得分图中的每一个点代表一个样本,负载图中的每一个点代表一个积分区间。通过得分图和负载图可以得到样

本之间的区别以及它们的代谢差异。通过图2A可以看到,正常人和乙肝患者血清样本在PC1维可以完全区分开,且对每组样本的PC1值进行统计分析表明这两类样本在PC1维具有显著统计学差异(P < 0.01)。图2B给出了对区分两类样本有贡献的代谢物变化,可以看到乙肝患者血清中,脂和葡萄糖的含量是升高的,而亮氨酸、缬氨酸、乳酸、丙氨酸、谷氨酰胺和胆碱类物质是降低的。

图3对PCA分析中有较大变化的代谢物进行了统计学t检验,结果表明这些代谢物在慢性乙肝患者血清中的变化均具有统计学意义(P < 0.05)。

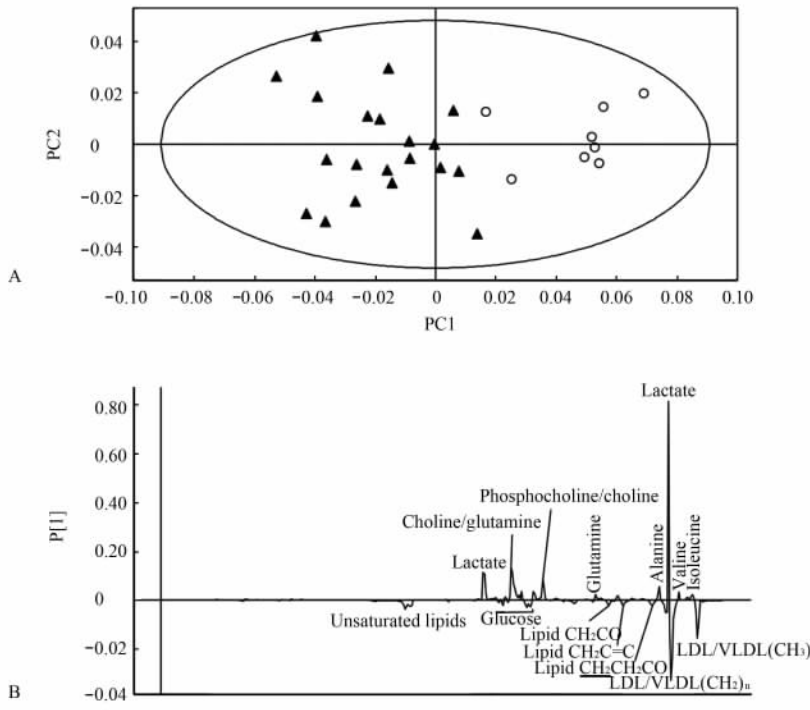


图2 正常人(○)和慢性乙肝患者(▲)血清<sup>1</sup>H CPMG谱的主成分分析得分图和负载图

Fig 2 Principal component analysis of serum from healthy human(○) and chronic hepatitis B patients (▲) based on <sup>1</sup>H CPMG spectra

A: Score plot; B: Loading plot

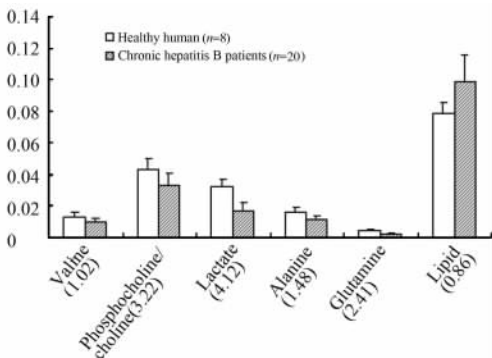


图3 正常人与慢性乙肝患者血清中几种代谢物相对浓度比较

Fig 3 Histogram demonstrating metabolic difference in sera of healthy human and chronic hepatitis B patients

\* P < 0.05 vs healthy human group;  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

液体高分辨核磁共振<sup>1</sup>H谱具有高分辨率和高灵敏度,能够给出丰富的代谢信息,已经成为一种研究生物样品(如尿液/血液/组织提取液等)代谢组变化的一种很重要的手段。CPMG谱中横向弛豫时间(T<sub>2</sub>)短的大分子信号峰如蛋白和部分脂类信号被抑制,选择性地突出了小分子代谢物的信号峰<sup>[7]</sup>,更适合分析小分子代谢物的变化。同时,主成分分析方法不仅可以分析样本间是否有差异,而且还可以给出具有较大贡献的代谢物组分。本研究通过对正常人和慢性乙肝患者血清代谢组的主成分分析和统计学分析,可知慢性乙肝患者血清中的脂类物质和葡

葡萄糖的含量是升高的,而亮氨酸、缬氨酸、乳酸、丙氨酸、谷氨酰胺以及胆碱类的含量则是降低的。

血清中脂类物质含量的改变在很多疾病中都有发现<sup>[8-9]</sup>,它表明血清中脂代谢发生改变。本研究观察到脂类物质含量升高的同时伴随磷脂酰胆碱的降低,这与肾细胞癌中研究结果是一致的<sup>[10]</sup>。磷脂酰胆碱和胆碱是存在于细胞膜上的磷脂,作为一种贮存的脂类来源,乙肝患者血清中脂类物质的升高和磷脂酰胆碱的降低可能意味着磷脂酰胆碱/胆碱向脂类的代谢加强。

此外,葡萄糖的含量在慢性乙肝患者血清中升高,而乳酸、丙氨酸及缬氨酸则是降低的,这可能与糖代谢过程的改变有关。在无氧条件下,葡萄糖会经过糖酵解过程转变成乳酸,而慢性乙肝患者的糖代谢发生紊乱,糖酵解过程可能被抑制,引起不同程度的血糖升高,这个发现与前人的研究结果一致<sup>[11]</sup>。而在某些疾病如肝癌<sup>[12]</sup>的研究中发现,葡萄糖的含量是降低的,而乳酸含量则是升高的,这可能是由于癌细胞的增殖加快,需能增加,使得更多的葡萄糖被消耗而产生能量,因而促进了糖酵解过程,使得乳酸聚积。

本研究还发现乙肝患者血清中丙氨酸和缬氨酸的含量是降低的,这也充分说明糖酵解过程被抑制。此外,慢性乙肝患者血清中的谷氨酰胺也是降低的,提示存在体内氮代谢的紊乱。

总之,基于核磁共振和模式识别的代谢组学方法能够给出慢性乙肝患者血清的代谢特征以及相关生化过程的改变,这可以从分子水平更好地认识慢性乙肝的发生机制,为乙肝的诊断提供可靠的分子水平上的代谢证据。

## [参考文献]

- [1] Yin P, Wan D, Zhao C, Chen J, Zhao X, Wang W, et al. A metabonomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILIC coupled with mass spectrometry[J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5: 868-876.
- [2] Lehnhardt F G, Bock C, Röhn G, Ernestus R I, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigation[J]. *NMR Biomed*, 2005, 18: 371-382.
- [3] Wu H, Zhang X, Liao P, Li Z, Li W, Li X, et al. NMR spectro-

scopic-based metabonomic investigation on the acute biochemical effects induced by Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> in rats[J]. *J Inorg Biochem*, 2005, 99: 2151-2160.

- [4] 高 岗, 杨根金, 姜子洋. 肾虚证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 565-568.
- Gao G, Yang G J, Lou Z Y. Metabonomic study on urine of rats with hydrocortisone-induced kidney deficiency syndrome[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 565-568.
- [5] 陶晓峰, 杨根金, 王晓钧, 魏锐利, 肖湘生, 施增儒. 离体眼眶肿瘤及正常组织超高场磁共振波谱特点的比较[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 882-884.
- Tao X F, Yang G J, Wang X J, Wei R L, Xiao X S, Shi Z R. Comparison of MR spectroscopic characteristics between orbital tumor and normal tissues *in vitro* by super high field MR[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 882-884.
- [6] Martínez-Granados B, Monleón D, Martínez-Bisbal M C, Rodrigo J M, del Olmo J, Lluch P, et al. Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning <sup>1</sup>H NMR spectroscopy[J]. *NMR Biomed*, 2006, 19: 90-100.
- [7] Wang Y, Bollard M E, Keun H, Antti H, Beckonert O, Ebbels T M, et al. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic angle spinning <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues[J]. *Anal Biochem*, 2003, 323: 26-32.
- [8] Kuliszkievicz-Janus M, Janus W, Baczyński S. Application of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in leukemia, lymphoma and some other non-haematological cancers [J]. *Anticancer Res*, 1996, 16 (3B): 1587-1594.
- [9] Gao H, Dong B, Liu X, Xuan H, Huang Y, Lin D. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma; high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 624: 269-277.
- [10] Tate A R, Foxall P J, Holmes E, Moka D, Spraul M, Nicholson J K, et al. Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of <sup>1</sup>H magic angle spinning (MAS) NMR spectra[J]. *NMR Biomed*, 2000, 13: 64-71.
- [11] 林秀峰. 肝病与血糖[J]. *实用肝脏病杂志*, 2007, 10: 426-428.
- [12] Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2605-2614.

[本文编辑] 尹 茶