

基于核磁共振技术的临床尿毒症的代谢组学研究

王振召¹ 魏斌斌¹ 陈 峥² 诸宏伟² 沈桂平¹ 冯江华^{* 1}

¹(厦门大学电子科学系,福建省等离子体与磁共振重点实验室,厦门 361005)

²(蚌埠医学院第一附属医院,蚌埠 233004)

摘 要 采用核磁共振技术与统计学分析方法,结合尿液的生化指标,进行临床尿毒症尿样的代谢组学研究。结果表明,尿毒症患者和健康对照人群尿样的代谢轮廓存在明显差异,通过核磁共振氢谱鉴定出 70 种代谢物,其中 20 种具有显著差异。与健康人群相比,尿毒症患者尿液中 2-羟基异丁酸、3-羟基丁酸、丙酮、丁酸、谷氨酸、肌氨酸、肌酐、赖氨酸、*N,N*-二甲基组氨酸、柠檬酸、天冬酰胺、乙醇和乙醇胺的含量明显偏低,而支链氨基酸(包括亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、牛磺酸、乳酸、 α -葡萄糖和 β -葡萄糖的含量明显偏高。这些代谢物涉及氨基酸代谢、能量代谢和脂质代谢中的多条代谢途径,可作为尿毒症代谢影响的潜在的生物标志物,有助于理解尿毒症发病的生化机制。

关键词 核磁共振; 代谢组学; 尿毒症; 统计学分析; 代谢通路分析

1 引言

尿毒症是多数慢性肾脏疾病发展到终末期阶段所表现出的临床综合征,它的发生会引起代谢性酸中毒以及多种营养物质的代谢紊乱,同时造成多数器官及系统病变,包括皮肤损害、心血管病变、胃肠道受损和脑出血等^[1-3],并常伴有多种并发症。

近年来,尿毒症的发病逐渐从中老年人群转移到青壮年^[4],由于早期症状不明显,患者常不重视,进入到尿毒症期却未发现,错过了最佳治疗时期,甚至一些已经确诊的尿毒症患者会因为担心透析治疗的副作用而拒绝接受合理的治疗。因此,对尿毒症的诊断与检查显得尤为重要。在慢性肾脏病的早期,临床上常表现为原发症状,对于尿毒症的传统检查手段主要包括血常规检查、尿常规检查、肾功能检测、血生化分析以及一些影像学检查^[5-8]。目前,关于尿毒症的研究多集中在尿毒症造成的多种并发症及对部分代谢物的影响,如 Madsen 等^[9]研究了尿毒症通过调节体内主动脉平滑肌细胞的表型来加速动脉粥样硬化; McIntire 等^[10]考虑到尿毒症患者食品利用率降低,研究了必需氨基酸亮氨酸在尿毒症的营养治疗中的合成代谢效应; Chen 等^[11]研究发现,尿毒症能使生长激素刺激的胰岛素样生长因子-1 表达减弱; Kumar 等^[12]研究了甲状旁腺激素在终末期肾脏病中的代谢情况; 王中华等^[13]研究了多种代谢物在大鼠肾脏中的分布。同时,也有大量的文献描述了胃肠道在肾脏损伤中的影响^[14,15]。然而,目前尚缺少对尿毒症总体的代谢机制变化的研究,对其具体的代谢特征描述不清楚,使其相应的诊断和有效治疗相对滞后。尿液作为肾脏的排泄物,包含众多小分子代谢物的信息,能够较为直观地反映肾脏代谢环境的变化。尿毒症是与肾损伤有关的疾病,体内的代谢变化多由肾损伤引起,所以通过分析尿样了解尿毒症具有明显的优势。尿样容易获得,且其中蛋白质和脂质含量低,可以体现核磁共振的检测特点,已成为基于核磁共振的代谢组学研究特别是肾脏疾病代谢组学研究中主要的生物样品^[16]。本研究应用基于核磁共振技术的尿样代谢组学的方法,以期获取可用于表征尿毒症的定性和定量指标,阐明尿毒症体内代谢机制和机体的生理变化,进而辅助临床上尿毒症的确认诊断和对症治疗。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

迈瑞 BS-350E 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); AVANCE III 600MHz 核

2018-04-30 收稿; 2018-07-15 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 31671920, 81272581) 资助

* E-mail: jianghua.feng@xmu.edu.cn

磁共振谱仪(德国 Bruker 公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

含 0.5% 的三甲基硅基丙酸钠 (TSP) 的重水(Sigma-Aldrich 公司); K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品的采集与配制 关于临床尿毒症的代谢组学研究采用对照的设计原则, 建立尿毒症实验组及正常对照组。尿毒症患者临床症状复杂, 常表现出厌食、呕吐、腹泻、口腔溃疡、呼气有尿味、少尿、面色苍白灰暗、消瘦、浮肿、全身瘙痒, 并伴有头痛、神志恍惚、乏力、失眠等一系列寒热、虚实错杂之象^[17]。本研究的尿毒症患者及健康对照组尿样均来自安徽省蚌埠医学院第一附属医院肾病科, 其中包括 29 例临床尿毒症患者的尿样及 39 例正常健康志愿者的尿液样本, 所有尿样均在同一时间段采集, 并记录性别、年龄等信息。在采集样本前均告知入试者本研究的内容, 所有参与研究的患者和健康志愿者均签署知情同意书。尿样采集后, 加入 0.1% NaN_3 , 同时进行液氮速冻后, -80°C 保存。

进行实验时, 将所采集到的尿液样品平均分为两份, 分别用于生化分析和代谢组学分析。

尿生化指标检测采用迈瑞 BS-350E 全自动生化分析仪, 对比较重要的临床尿生化指标, 包括尿素、尿酸、葡萄糖和肌酐, 利用随机软件获取相应的分析结果。对于代谢组学分析样本, 取出保存的尿液样本进行室温解冻, 充分融化后摇匀。离心, 取 500 μL 上清液, 与 50 μL 磷酸盐重水缓冲溶液 (1.5 mol/L, pH=7.4, 含 0.5% TSP) 混合, 振荡 10 s 使混合均匀, 于 4°C 以 10000 g 离心 10 min, 取上清液 500 μL 移至 5 mm 核磁管中进行核磁共振检测。

2.2.2 核磁共振氢谱数据采集及处理

尿样的 $^1\text{H-NMR}$ 实验在 600MHz 核磁共振谱仪上进行, ^1H 共振频率为 600.13 MHz。实验温度为 298 K, 采用带有 NOESYPR1D 脉冲序列 ($RD-90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ-Acq$) 进行采样。实际采样中, 使用 5 mm 的 CPBBO 正向观察宽带探头, 空扫次数为 8 次, 弛豫延迟为 4.0 s, 采样点数为 32 K, 采样时间 2.66 s, 累加次数为 32 次, 谱宽为 20 ppm。

对采集到的谱图利用 MestReNova (Version 9.0.1, Mestrelab Research S.L., Spain) 软件将原始 FIDs 信号充零到 128 K, 同时乘以线宽为 1.0 Hz 的指数窗函数。傅里叶变换后, 将时域信号谱图进行人工的相位校正和基线调整, 并以 TSP 在 0 ppm 处的单峰进行定标。切除化学位移 6.20~5.45 ppm 及 5.20~4.45 ppm 范围内的谱图, 消除尿素峰及残留水峰对谱图的影响, 同时保留 4.67 ppm 处 β -葡萄糖双峰以讨论 β -葡萄糖的变化情况, 对每个谱图以 0.005 ppm 为积分间距进行等间距分段积分, 积分范围为 9.50~0.60 ppm, 对积分数据相对于谱图的总积分面积进行归一化。

2.2.3 统计学分析及通路分析 使用 SIMCA (version 14.1, Umetrics AB, Umea Sweden) 对归一化的数据进行基于多变量统计的模式识别分析。首先进行主成分分析 (PCA), 采用中心化换算 (Ctr) 的数据标度换算方式获取尿毒症患者与健康对照组之间的代谢轮廓和差异。进一步进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 采用自适换算 (UV) 的数据标度换算方式, 最大化地凸显模型内部疾病组与对照组之间的差异。然后, 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 Q^2 值对模型的有效性进行进一步的检验, 同时获取代谢物差异特征相关的相关系数值 (r) 和变量重要性 (VIP) 值。

同时, 为了更好地进行特征代谢物的筛选, 对积分数据进行了单变量统计学分析, 从相应信号的积分区域对各代谢物的相对浓度进行了定量分析。为了避免谱图中重叠峰造成干扰, 选择了具有最少重叠的特征峰对有意义的代谢物进行统计分析。统计分析的结果用差异倍数 (Fold-change) 值和 t 检验进行评估, 其中 t 检验值转化为 p 值, 用来统计差异的显著性, 以此获得有显著变化的代谢产物。Fold-change 值是两组代谢物浓度的比值, 用来表示具有差异的代谢物的变化情况。

使用 Fold-change 值和 t 检验值, 并结合 OPLS-DA 中导出的相关系数值和 VIP 值, 完成火山图的绘制, 用于总结和识别潜在的生物标志物。筛选差异代谢物的标准为: 相关系数的绝对值 ($|r|$) >0.85 、VIP 值取前 10% 及 p 值 (t -test 值转换而来) <0.001 (即纵坐标值 >3)。筛选出的差异代谢物可作为潜在的生物标志物。

在筛选出潜在的生物标志物后,为了更进一步了解尿毒症患者与健康人群之间的代谢组学差异。利用 HMDB(Human Metabolome Database ,<http://www.hmdb.ca>)、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ,<http://www.kegg.jp>) 以及 MetaboAnalyst3.0 在线分析工具(<http://www.metaboanalyst.ca/>) 等公开的网上数据库,对模型的差异代谢物的代谢信息进行分析,探究其中与尿毒症相关的代谢通路,最后给出合理的生物化学解释。

3 结果与讨论

3.1 尿液的生化分析

首先对采集到的尿样进行状态观察和生化分析。对比健康对照组和尿毒症患者的尿样发现,尿毒症患者的尿样呈现出清如水的状态,样品澄清无沉淀,这可能是由于血液透析造成的结果,而健康对照组的尿样呈现出正常的尿黄色,且其中有少量沉淀。同时,尿样生化指标分析结果(表1)表明,尿毒症患者尿注中尿酸、尿素和肌酐的含量显著偏低,而尿中葡萄糖的含量明显偏高,表明尿毒症患者体内肾小管细胞大量受损,同时,体内葡萄糖的氧化分解通路受阻,大量糖分分解为葡萄糖,却不能得到充分而有效的利用^[18-20]。

表1 尿毒症患者和健康人群尿液主要临床生化指标

Table 1 Primary urinary biochemical index of uremia patients and health control

尿生化指标 Urinary biochemical index	尿毒症 Uremia patients	健康对照 Health control subjects	<i>p</i>
尿酸 Uric acid(UA) ($\mu\text{mol/L}$)	41.60 \pm 12.66	1063.71 \pm 351.87	3.8 \times 10 ⁻²⁰
尿素 Urea(mmol/L)	4.58 \pm 1.04	130.45 \pm 42.72	2.4 \times 10 ⁻²⁰
肌酐 Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	62.21 \pm 34.42	6150.16 \pm 2643.98	9.0 \times 10 ⁻¹⁷
葡萄糖 Glucose(mmol/L)	1.69 \pm 0.43	0.01 \pm 0.09	3.2 \times 10 ⁻¹⁹

3.2 核磁共振谱图分析

图1为尿毒症患者(U)和健康对照组(C)的尿液样本的核磁共振氢谱平均积分谱图(通过 Matlab 重新绘制)。根据文献[21]、经验以及参考公用数据库的代谢组学相关数据库(Human Metabolome Database ,<http://www.hmdb.ca>) ,对谱图进行代谢物的准确归属。本研究从谱图中归属出70种代谢物,相应的代谢物的详细信息见表2。肉眼可见尿毒症患者和健康对照组的特征性核磁共振谱图,并发

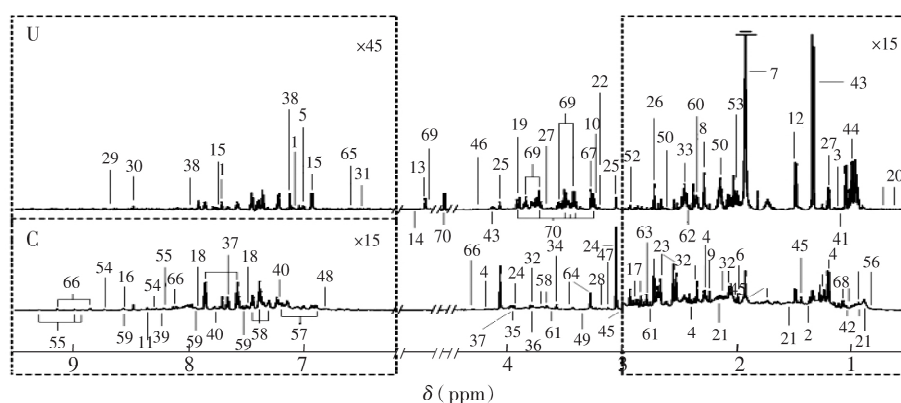


图1 尿毒症患者(U)和健康对照人群(C)尿液的平均¹H NMR谱图(9.50~0.60 ppm)。谱图中去除了6.20~5.45 ppm处尿素峰及5.20~4.68 ppm和4.64~4.45 ppm两处水峰及其影响的谱峰区域,虚线框起来的区域分别放大了相应的倍数,使谱峰清晰可辨。图中各代谢物的编号及详细归属信息见表2

Fig.1 Mean ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (9.50–0.60 ppm) of urine obtained from uremia patients (U) and healthy control subjects (C). The spectral regions in the dashed boxes are respectively vertically expanded compared with the spectral region of 3.00–6.20 ppm for the clarity. The keys for the numbers of assigned metabolites are given in Table 2

表 2 人尿液¹H NMR谱图鉴定出的代谢物

Table 2 Identified metabolites from the NMR spectra of human urine

编号 No.	代谢物 Metabolites	化学位移(峰型) ¹ H chemical shift (ppm) (multiplicity)	编号 No.	代谢物 Metabolites	化学位移(峰型) ¹ H chemical shift (ppm) (multiplicity)
1	1-甲基组氨酸 1-Methylhistidine (1-MH)	7.04(s ^a), 7.69(s)	40	吲哚-3-乳酸 Indole-3-lactate(IL)	7.18(d), 7.21(d), 7.75(d)
2	2-羟基异丁酸 2-Hydroxyisobutyrate(HIB)	1.36(s)	41	异丁酸 Isobutyrate(IB)	1.07(d)
3	2-氧异戊酸 2-Oxoisovalerate(OIV)	1.11(d)	42	异亮氨酸 Isoleucine(Ile)	0.94(t), 1.01(d)
4	3-羟基丁酸 3-Hydroxybutyrate(3-HB)	1.19(d), 2.28(dd), 2.40(dd), 4.16(m)	43	乳酸 Lactate(Lac)	1.34(d), 4.12(q)
5	3-甲氧基-4-羟基扁桃酸 3-Methoxy-4-hydroxymandelate(MHM)	6.98(d)	44	亮氨酸 Leucine(Leu)	0.97(t)
6	乙酰胺 Acetamide(AD)	1.99(s)	45	赖氨酸 Lysine(Lys)	1.46(m), 1.74(m), 1.89(m), 3.03(t)
7	乙酸 Acetate(Ace)	1.92(s)	46	苹果酸 Malate(Mal)	4.30(m)
8	乙酰乙酸 Acetoacetate(AA)	2.28(s)	47	丙二酸 Malonate(M)	3.12(s)
9	丙酮 Acetone(Act)	2.24(s)	48	间-羟基苯乙酸 <i>m</i> -Hydroxyphenylacetate(<i>m</i> -HPA)	6.79(m), 6.80(m)
10	乙酰胆碱 Acetylcholine(Ach)	3.23(s)	49	甲醇 Methanol(Mol)	3.37(s)
11	腺苷 Adenosine(Ads)	8.34(s)	50	蛋氨酸 Methionine(Met)	2.14(s), 2.16(m), 2.66(t)
12	丙氨酸 Alanine(Ala)	1.49(d)	51	甲基丙二酸 Methylmalonate(MM)	1.25(d)
13	尿囊酸 Allantoate(Alt)	5.35(m)	52	<i>N,N</i> -二甲基甘氨酸 <i>N,N</i> -Dimethylglycine(DMG)	2.93(s)
14	尿囊素 Allantoin(All)	5.39(s)	53	<i>N</i> -乙酰丙氨酸 <i>N</i> -Acetylalanine(NAA)	2.03(s)
15	氨基马尿酸 Aminohippurate(AH)	6.91(d), 7.71(d)	54	烟碱 Nicotinamide(NA)	8.28(m), 8.72(d)
16	新烟碱 Anabasine(Ab)	8.53(d)	55	<i>N</i> -甲基烟酰胺 <i>N</i> -Methylnicotinamide(NMN)	8.18(m), 8.91(d), 8.97(d), 9.29(s)
17	天冬酰胺 Asparagine(Asn)	2.83(m), 2.91(m)	56	泛酸 Pantothenate(Pan)	0.84(s), 0.94(s)
18	苯甲酸 Benzoate(Ben)	7.48(t), 7.87(d)	57	对-羟基苯乙酸 <i>p</i> -Hydroxyphenylacetate(<i>p</i> -HPA)	6.86(d), 7.17(d)
19	甜菜碱 Betaine(Bet)	3.90(s)	58	苯乙酰甘氨酸 Phenylacetylglycine(PAG)	3.68(s), 3.75(d), 7.29(m), 7.36(m), 7.43(m)
20	胆汁酸 Bile acid(BA)	0.65(m), 0.75(m)	59	吡啶甲酸 Picolinate(PA)	7.51(d), 7.90(d), 8.55(m)
21	丁酸 Butyrate(Bu)	0.91(t), 1.56(m), 2.19(m)	60	丙酮酸 Pyruvate(Py)	2.35(s)
22	胆碱 Choline(Cho)	3.20(s)	61	肌氨酸 Sarcosine(Sar)	2.76(s), 3.60(s)
23	柠檬酸 Citrate(Ci)	2.54(d), 2.68(d)	62	琥珀酸 Succinate(Suc)	2.41(s)
24	肌酸 Creatine(Cr)	3.04(s), 3.94(s)	63	琥珀酰亚胺 Succinimide(Sum)	2.79(s)
25	肌酐 Creatinine(Cn)	3.05(s), 4.06(s)	64	牛磺酸 Taurine(Tau)	3.29(t), 3.45(t)
26	二甲胺 Dimethylamine(DMA)	2.72(s)	65	反式乌头酸 <i>trans</i> -Aconitate(Aco)	6.60(s)
27	乙醇 Ethanol(Eth)	1.20(t), 3.65(q)	66	葫芦巴碱 Trigonelline(Tri)	4.44(s), 8.10(m), 8.84(t), 9.13(s)
28	乙醇胺 Ethanolamine(EA)	3.15(t)	67	<i>N</i> -氧三甲胺 Trimethylamine <i>N</i> -oxide(TMAO)	3.27(s)
29	叶酸 Folic acid(FA)	8.68(s)	68	缬氨酸 Valine(Val)	0.99(d), 1.05(d)
30	甲酸 Formate(For)	8.47(s)	69	α -葡萄糖 α -Glucose(α -Glc)	3.42(t), 3.54, 3.71(t), 3.84(m), 5.24(d)
31	富马酸 Fumarate(Fum)	6.53(s)	70	β -葡萄糖 β -Glucose(β -Glc)	3.25, 3.41(t), 3.46(m), 3.49(t), 3.72(dd), 3.90(dd)
32	谷氨酸 Glutamate(Glu)	2.07(m), 2.13(m), 2.35(m), 3.78(m)			
33	谷氨酰胺 Glutamine(Gln)	2.46(m)			
34	甘氨酸 Glycine(Gly)	3.57(s)			
35	乙醇酸 Glycolate(Gla)	3.96(s)			
36	胍基乙酸盐 Guanidoacetate(GA)	3.80(s)			
37	马尿酸 Hippurate(Hip)	3.97(d), 7.56(t), 7.64(t), 7.84(d)			
38	组氨酸 Histidine(His)	7.12(s), 7.93(s)			
39	次黄嘌呤 Hypoxanthine(HX)	8.20(s), 8.22(s)			

注: ^a峰型: s, 单峰; d, 双重峰; t, 三重峰; q, 四重峰; dd, 双重双重峰; m, 多重峰^a Multiplicity: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublet of doublets; m, multiplet.

现其中两组具有明显的代谢差异,在尿毒症患者的谱图中,大多数代谢物特别是低场区(9.50~6.20 ppm)明显偏低,证实了尿毒症的代谢扰动影响终端尿液的代谢产物,使其表现出极大的变化。从谱图中可分辨出一些特征性的差异代谢物,如尿毒症组中具有较高浓度的乙酸、乳酸、葡萄糖和牛磺酸等。

为进一步获取其详细的定量生物化学信息,从而对尿毒症组和正常对照组之间的差异进行客观系统的评估,需要对谱图导出的积分数据进行统计学相关分析。

3.3 统计结果分析

由尿毒症患者和健康对照人群的主成分分析(PCA)得分图(图2A)可见,尿毒症组和正常对照组出现了明显区别,表明两者存在显著的代谢差异,说明尿毒症确实影响到了机体的代谢功能。另外,尿毒症患者团聚性较差,可能是由于这些患者来自于不同发展期的尿毒症造成的。进一步对两组进行组间正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),进而获取两者之间显著性的代谢差异。从其模型参数和排列实验的结果可以发现尿毒症组与对照组具有明显区别(图2B和图2C),反映了尿毒症造成的体内的代谢紊乱。

通过核磁共振谱图的积分数据进行单变量统计学分析,使用相应特征峰信号的积分区域对各代谢物的相对浓度进行定量分析,可以获得尿毒症患者和健康对照人群尿样中代谢物含量的差异倍数(fold-change)值和通过t检验后转化的p值。并结合多变量统计分析中模型的相关系数(r)和变量重要性(VIP)值,可以构建四维(r值、VIP值、p值和fold-change值)火山图(图2D)。进而可以系统性地对代谢物进行统计学分析,以获得有显著差异的潜在的特征代谢产物^[22]。彩色火山图表明尿毒症组与对照组之间的代谢物变化,其中X轴为 $\log_2(\text{Fold-change})$,Y轴为 $-\lg p$,圆的大小为VIP值(按照取值分为10%、20%和剩余部分3部分,圆越大表示VIP值越靠前),圆的颜色深浅表示相关系数的绝对值(圆的颜色越温暖表示相关系数的绝对值越大)。使用三标准可以筛选得到尿毒症患者的潜在的特征代谢物:相关系数的绝对值($|r|$)>0.85、VIP值取前10%及 $p < 0.001$ (即纵坐标值>3)。火山图中的代谢物用缩写表示,详细信息参见表2和表3。

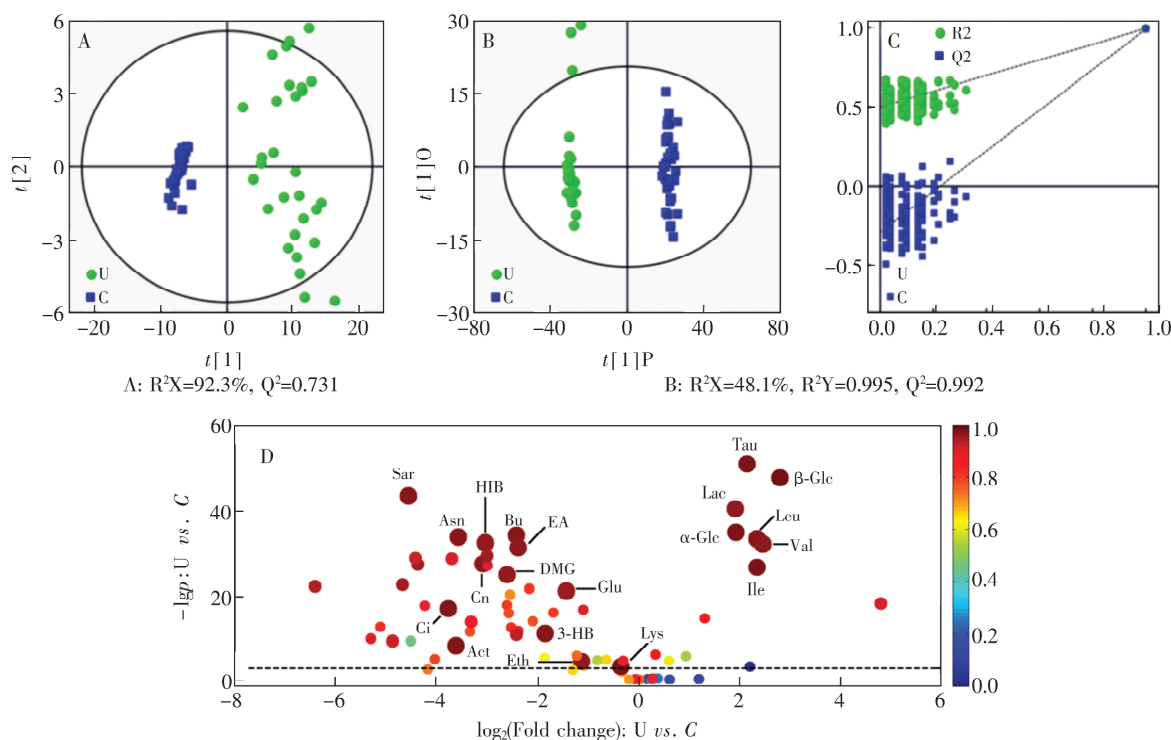


图2 尿毒症患者(U)与健康对照组(C)尿样的主成分分析得分图(A)、OPLS-DA得分图(B)、模型的排列实验交叉验证图(C)和相应的火山图(D)

Fig.2 Principal component analysis (PCA) (A), orthogonal partial least square-discriminate analysis (OPLS-DA) (B), cross validation by permutation test (C) and corresponding volcano plots (D) based on NMR data of urine obtained from the uremia patients (U) and healthy controls (C)

表 3 火山图中差异代谢物的详细信息

Table 3 Summary of metabolites statistical data

代谢物 Metabolites	p^a	r^b	VIP ^c	代谢物 Metabolites	p^a	r^b	VIP ^c
2-Hydroxyisobutyrate	3.8210^{-33}	-0.966	1.43	Isoleucine	2.02×10^{-27}	0.985	1.46
3-Hydroxybutyrate	7.47×10^{-12}	-0.977	1.44	Lactate	3.88×10^{-41}	0.97	1.43
Acetone	4.63×10^{-9}	-0.983	1.46	Leucine	4.17×10^{-34}	0.979	1.45
Asparagine	1.52×10^{-34}	-0.979	1.45	Lysine	3.98×10^{-4}	-0.985	1.46
Butyrate	5.87×10^{-35}	-0.977	1.45	<i>N,N</i> -Dimethylglycine	1.08×10^{-25}	-0.972	1.44
Citrate	9.50×10^{-18}	-0.981	1.45	Sarcosine	3.04×10^{-44}	-0.978	1.45
Creatinine	2.69×10^{-28}	-0.973	1.44	Taurine	1.26×10^{-51}	0.986	1.46
Ethanol	2.08×10^{-5}	-0.971	1.44	Valine	7.61×10^{-33}	0.976	1.44
Ethanolamine	4.54×10^{-32}	-0.974	1.44	α -Glucose	1.23×10^{-35}	0.988	1.46
Glutamate	6.44×10^{-22}	-0.962	1.43	β -Glucose	2.11×10^{-48}	0.995	1.47

^a 由 t 检验转化而来的 p 值; ^b 从 OPLS-DA 模型中导出的相关系数值 (r) 值的正负表示尿毒症患者尿液中浓度的相对较高和较低; ^c 从 OPLS-DA 模型中导出的 VIP 值。

^a The p -values were transformed by the values of Student's t -test. ^b The correlation coefficient (r) values came from OPLS-DA model. The positive and negative signs indicate the higher and lower concentrations in the urine of uremia patients, respectively. ^c The variable importance for projection (VIP) values came from OPLS-DA models.

从火山图(图 2D)可见 相较于健康对照组,尿毒症患者尿液中的肌氨酸、天冬酰胺、2-羟基异丁酸、丁酸、乙醇胺、肌酐、*N,N*-二甲基组氨酸、谷氨酸、柠檬酸、3-羟基丁酸、丙酮、乙醇和赖氨酸的含量显著偏低,而牛磺酸、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖、乳酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的含量显著偏高。这些代谢物的变化可以作为潜在的变化信息用于表征尿毒症患者的代谢情况。

3.4 代谢通路分析

整体性的代谢扰动需要通过代谢通路图来进行描述。借助于 KEGG 数据库可以得到差异代谢物(图 2D 和表 3)之间的相互关系,进而通过 Visio 绘制出相应的代谢通路图。从尿毒症对体内造成干扰的代谢通路图(图 3)可见,这些代谢途径主要涉及到糖代谢、能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢中的部分代谢。

在尿毒症患者尿液内,支链氨基酸(包括缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)的含量明显偏高。支链氨基酸

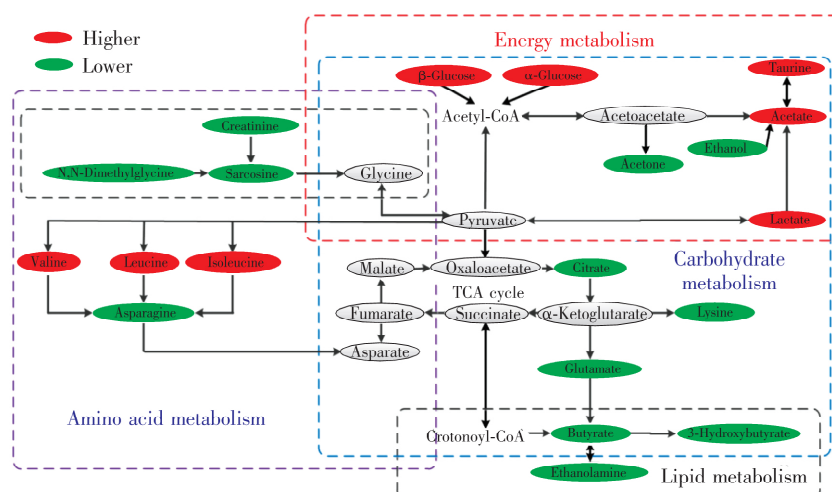


图 3 尿毒症对体内造成干扰的代谢通路图。图中椭圆形框中彩色的代谢物为出现明显差异的代谢物。其中红色和绿色分别表示该代谢物在尿毒症患者尿液中含量显著偏高和偏低。不同的代谢路径用不同颜色的大方框表示

Fig.3 Disturbed metabolic pathways involved in uremia. The higher, lower and no significantly changed levels of the metabolites are represented by red, green and black ellipses. The different metabolic pathways are indicated by the different font colors

通常是重要而有效的营养补充剂。人体内的支链氨基酸的来源主要是日常蛋白质类食物的摄入及体内相关蛋白的分解,正常人体内蛋白质与氨基酸的代谢处于动态平衡,体内氨基酸的含量维持在稳定水平,不会出现有差异性的变化。支链氨基酸相较于其它氨基酸能够产生更多的能量^[23],释放大量的ATP,同时能够分解成相应的辅酶A,参与到三羧酸循环(TCA循环)中,被进一步用作转化为其它氨基酸、促进蛋白质的合成与分解、促进糖的异生以及合成其它营养物质等^[24],并且支链氨基酸具有调节免疫的作用^[25,26]。支链氨基酸含量偏高,表明其参与的代谢反应受阻,三者的含量在体内造成了积累。支链氨基酸产生能量减少,一定程度上造成了体内供能不足,同时免疫功能受到影响,体内合成抗体减少,机体进一步受损。

支链氨基酸能够转化为天冬酰胺并进一步转氨基生成天冬氨酸,天冬氨酸被用作蛋氨酸、苏氨酸和赖氨酸等的原料^[27],支链氨基酸含量的升高造成了天冬酰胺的减少,使得向天冬氨酸的代谢途径受到影响。

N,N-二甲基甘氨酸(DMG)是氨基酸的衍生物,肌酸又称*N*-甲基甘氨酸,两者均为机体内胆碱向甘氨酸代谢的中间产物,DMG在体内多种代谢中作为的甲基供体,肌酸在ATP能量代谢中可促进ATP的合成^[28],两者含量的减少表明相关代谢的紊乱。肌酐作为小分子量毒物,肾脏正常时几乎全部随尿排出,含量不受影响,而尿毒症患者往往会在体内蓄积造成通过尿液的排出含量较少。

赖氨酸和谷氨酸含量的减少,可能是受到了TCA循环的影响。赖氨酸具有保持体内正常的渗透压、增强免疫力的作用^[29],其含量的减少会导致机体的进一步损伤。

能量代谢受到的影响不仅包括支链氨基酸的功能减弱,葡萄糖的糖酵解及TCA循环也会影响到能量代谢,尿毒症患者尿液中 α -葡萄糖、 β -葡萄糖及乳酸的含量增加,柠檬酸含量减少。柠檬酸是TCA循环中重要的中间产物,柠檬酸含量的减少表明了TCA循环的异常,造成线粒体功能的紊乱,并进一步导致细胞的凋亡和分化。葡萄糖含量的增加表明体内大量的营养物质被分解,同时乳酸含量升高表明被分解的营养物质有氧呼吸参与较少,大都参与到了无氧糖酵解中分解成乳酸并产生少量的ATP。由于尿毒症导致体内有氧代谢及其它产能方式受阻,糖酵解成为了患者获取能量的主要来源,而糖酵解产生能量较少,需要更多的营养物质分解成葡萄糖,造成了葡萄糖及乳酸含量的升高。

牛磺酸是一种含硫氨基酸,游离于细胞液和体液中,具有清除自由基、调节渗透压、维持体液平衡等作用^[30]。肾脏会根据体内牛磺酸的含量调节它的排泄^[31],尿毒症患者的肾脏受损,导致尿液中牛磺酸的含量升高。而丙酮和乙醇在体内蓄积使得尿液中两者的含量减少。

丁酸是短链脂肪酸的一种,主要来源于肠道内微生物对未吸收的碳水化合物以及蛋白质发酵的产物中,在人类体内能够促进坏死的组织快速恢复^[32],其含量的减少可能导致组织坏死的进一步恶化。3-羟基丁酸主要是人体内脂肪酸代谢的产物之一,同时与体内能量代谢紊乱有关^[33]。乙醇胺参与体内磷脂代谢,并与ATP反应生成ADP和磷酸乙醇胺^[34]。3-羟基丁酸和乙醇胺的减少表明了脂质代谢和能量代谢的紊乱。

结合尿毒症患者和健康对照组尿液的分析,可以发现二者存在显著的差异代谢物,主要集中在支链氨基酸的代谢、葡萄糖的能量代谢、三羧酸循环代谢和脂代谢,而其代谢状况表明尿毒症造成了体内严重的代谢紊乱。

4 结论

尿毒症会引起体内多种代谢紊乱。本研究应用基于¹H-NMR的尿样代谢组学方法,通过对尿毒症患者与正常健康组尿样的对比分析,分析了尿毒症引起的代谢紊乱情况,明确了一些潜在的特征代谢物的发生发展特征,并用于初步阐述尿毒症的生化机制和病理特征。后续的研究中,会结合尿毒症早期及通过手术手段治疗后恢复的情况进行研究,为尿毒症的诊断和治疗提供更好的实验依据。

References

- 1 Christoffersen C, Bartels E D, Aarup A, Nielsen L B, Pedersen T X. *Eur. J. Pharmacol.*, 2017, 816(53): 154-160

- 2 Smogorzewski M J. *J. Ren. Nutr.* , **2017** , 27(6) : 465-469
- 3 Ho K J , Xue H , Mauro C R , Nguyen B , Yu P , Tao M , Seidman M A , Brunelli S M , Ozaki C K. *J. Surg. Res.* , **2013** , 179(1) : 175-182
- 4 CHEN Hong-Yun. *Healthy People* , **2014** , 8(23) : 178-179
谌红云. *大家健康* , **2014** , 8(23) : 178-179
- 5 Lin Y J , Guo H R , Chang Y H , Kao M T , Wang H H , Hong R I. *Sens. Actuators B* , **2001** , 76(1-3) : 177-180
- 6 Yang C C , Chen T C , Wu C S , Cheng B C , Lam K K , Chien Y S , Chuang F R , Lee C T. *Gend. Med.* , **2010** , 7(5) : 451-457
- 7 Wong G , Howard K , Chapman J R , Tong A , Bourke M J , Hayen A , Macaskill P , Hope R L , Williams N , Kieu A. *BMC Public Health* , **2011** , 11(1) : 516
- 8 Wong M C Y , Piaggio G , Damasio M B , Molinelli C , Ferretti S M , Pistorio A , Ghiggeri G , Degl'Innocenti M L , Canepa A , Incarbone V , Mattioli G. *J. Pediatr. Urol.* , **2018** , 14(1) : 68 e61-68 e66
- 9 Madsen M , Aarup A , Albinsson S , Hartvigsen K , Sorensen C M , Turczynska K , Nielsen L B , Pedersen T X. *Atherosclerosis* , **2017** , 257: 64-70
- 10 McIntire K L , Chen Y , Sood S , Rabkin R. *Kidney Int.* , **2014** , 85(2) : 374-382
- 11 Chen Y , Biada J , Sood S , Rabkin R. *Kidney Int.* , **2010** , 78(1) : 89-95
- 12 Kumar K U , Rao N M , Naidu M P. *Int. J. Clin. Surg.* , **2014** , 2(4) : 148-158
- 13 WANG Zhong-Hua , HE Bing-Shu , SUN Cheng-Long , HE Jiu-Ming , ZHANG Rui-Ping , ABLIZ Zeper. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2018** , 46(3) : 406-412
王中华, 何秉淑, 孙成龙, 宋肖炜, 贺玖明, 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜. *分析化学* , **2018** , 46(3) : 406-412
- 14 Mahmoodpoor F , Rahbar Saadat Y , Barzegari A , Ardalan M , Zununi Vahed S. *Biomed. Pharmacother.* , **2017** , 93: 412-419
- 15 Wanchai K , Pongchaidecha A , Chatsudthipong V , Chattipakorn S C , Chattipakorn N , Lungkaphin A. *Am. J. Med. Sci.* , **2017** , 353(1) : 59-69
- 16 HU Yong-Sheng , XU Peng-Tao , YE Sheng-Jie , SHI Wen-Yu , GAO Hong-Chang , ZHUO Yang , ZHAO Liang-Cai. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2018** , 46(2) : 170-177
胡永胜, 徐鹏涛, 叶胜捷, 施雯宇, 高红昌, 卓阳, 赵良才. *分析化学* , **2018** , 46(2) : 170-177
- 17 LIU Lai-Lai , DUAN Juan. *J. Yunnan Univ. Tradit. Chin. Med.* , **2013** , 36(4) : 93-95
刘莱莱, 段娟. *云南中医学院学报* , **2013** , 36(4) : 93-95
- 18 Awadh M A , Mohamed K A , Ahmed E A M , Amira A B , Marwa S M D. *Saudi J. Biol. Sci.* , **2015** , 22(3) : 302-311
- 19 Simon C , Elizabeth S. *Anaesth. Intensive. Care Med.* , **2006** , 7(2) : 46-48
- 20 Barrak M P. *Clin. Lab. Med.* , **2015** , 35(3) : 487-502
- 21 Li Z , Lin C , Xu J , Wu H , Feng J , Huang H. *Anal. Biochem.* , **2015** , 477: 105-114
- 22 Lin C , Wei Z , Cheng K K , Xu J , Shen G , She C , Zhong H , Chang X , Dong J. *Sci. Rep.* , **2017** , 7(1) : 6820
- 23 Ji L L , Miller R H , Nagle F J , Lardy H A , Stratman F W. *Metabolism* , **1987** , 36(8) : 748-752
- 24 Lee C C , Watkins S M , Lorenzo C , Wagenknecht L E , Il'Yasova D , Chen Y I , Haffner S M , Hanley A J. *Diabetes Care* , **2016** , 39(4) : 582-588
- 25 Edmonds M S , Baker D H. *J. Anim. Sci.* , **1987** , 65(3) : 699-705
- 26 Gatnau R , Zimmerman D R , Nissen S L , Wannemuehler M , Ewan R C. *J. Anim. Sci.* , **1995** , 73(1) : 159-165
- 27 Iida A. *Nat. Genet.* , **2005** , 37(2) : 138-144
- 28 WANG Meng , LIU Ming , GUO Lin. *Chin. J. Clin. Lab. Sci.* , **2013** , 31(6) : 401-405
王萌, 刘明, 郭健. *临床检验杂志* , **2013** , 31(6) : 401-405
- 29 Klasing K C , Barnes D M. *J. Nutr.* , **1988** , 118(9) : 1158-1164
- 30 Ito T , Yoshikawa N , Inui T , Miyazaki N , Schaffer S W , Azuma J. *PLoS One* , **2014** , 9(9) : e107-e109
- 31 MacLellan D L , Mataija D , Doucette A , Huang W , Langlois C , Trottier G , Burton I W , Walter J A , Karakach T K. *Mol. Biosyst.* , **2011** , 7(7) : 2181-2188
- 32 Canani R B , Di Costanzo M , Leone L. *Clin. Epigenetics* , **2012** , 4(1) : 4

- 33 Plecko B , Stoeckler-Ipsiroglu S , Schober E , Harrer G , Mlynarik V , Gruber S , Moser E , Moeslinger D , Silgoner H , Ipsiroglu O. *Pediatr. Res.* , **2002** , 52(2) : 301-306
- 34 Kiss Z , Mukherjee J J , Crilly K S , Chung T. *Febs J.* , **2015** , 250(2) : 395-402

¹H Nuclear Magnetic Resonance-based Investigation of Uremia by Metabolomic Analysis

WANG Zhen-Zhao¹ , WEI Bin-Bin¹ , CHEN Zheng² , ZHU Hong-Wei² , SHEN Gui-Ping¹ , FENG Jiang-Hua^{* 1}

¹(Department of Electronic Science , Fujian Provincial Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

²(The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College , Bengbu 233004 , China)

Abstract At present , little is known about metabolic mechanism of uremia. In this study , uremia was investigated by combination of NMR spectroscopy , statistical analysis and urinary biochemical assays to provide the basis of the metabolic characteristics of uremia. The characteristic metabolites of uremia were identified from the urine of the uremia patients. The results showed that the urinary levels of 2-hydroxyisobutyrate , 3-hydroxybutyrate , acetone , butyrate , glutamate , sarcosine , creatinine , lysine , *N,N*-dimethylglycine , citrate , asparagine , ethanol and ethanolamine were reduced , while the urinary levels of branched-chain amino acids (including leucine , valine and isoleucine) , taurine , lactate and glucose were higher in uremia patients than that in the healthy subjects. The corresponding disturbed metabolic pathways were derived from the characteristic metabolites , in which amino acid , energy and lipid metabolisms were involved. The specific characteristic metabolites will help to understand the underlying biochemical mechanisms of the onset of uremia.

Keywords Nuclear magnetic resonance; Metabonomics; Uremia; Statistical analysis; Metabolic pathway analysis

(Received 30 April 2018; accepted 15 July 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671920 , 81272581) .