

学校编码: 10384  
学号: 19820111152882

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

基于<sup>1</sup>H NMR的妊娠期糖尿病代谢组学研究

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于<sup>1</sup>H NMR的妊娠期糖尿病代谢组学研究

Gestional Diabets Mellitus Metabonomics Based on  
<sup>1</sup>H NMR Spectroscopy

指导教师姓名: 董继扬 教授  
专 业 名 称: 电子与通信工程  
论文提交日期: 2014年04月  
论文答辩时间: 2014年 月  
学位授予日期: 2014年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014年04月

厦 门 大 学



## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日



## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(  )2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日



# 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
第一章 绪 论 .....	1
1.1 代谢组学简介 .....	1
1.2 核磁共振技术在代谢组学中的应用 .....	2
1.3 论文结构 .....	4
第二章 妊娠期糖尿病代谢组学的研究现状 .....	9
2.1 妊娠期糖尿病简介 .....	9
2.2 妊娠期糖尿病的临床筛查 .....	9
2.2.1 高危因素 .....	9
2.2.2 筛查时间 .....	10
2.2.3 筛查方法 .....	10
2.2.4 诊断标准 .....	11
2.2.5 临床筛查方法的不足 .....	11
2.3 妊娠期糖尿病代谢组学研究的综述 .....	12
2.3.1 血样的代谢轮廓分析 .....	13
2.3.2 尿样的代谢轮廓分析 .....	15
2.3.3 羊水的代谢轮廓分析 .....	17
2.3.4 胎盘组织的代谢轮廓分析 .....	18
2.3.5 饮食对代谢轮廓的影响 .....	19
2.3.6 受损代谢通路分析 .....	20
2.4 代谢组学在妊娠期糖尿病诊断中的潜在优势 .....	21
2.5 本章小结 .....	22
第三章 妊娠期糖尿病体液样品的 $^1\text{H}$ NMR 代谢轮廓分析 .....	29

3.1 实验与方法	29
3.1.1 样品采集	29
3.1.2 样品制备及 $^1\text{H}$ NMR 谱采集	29
3.1.3 数据预处理	31
3.2 实验的结果与分析	32
3.2.1 血清样品分析	32
3.2.2 尿液样品分析	38
3.3 本章小结	44
第四章 总结与展望	53
4.1 本文总结	53
4.2 展望	53
攻读硕士期间发表的论文	57
致 谢	58



# CONTENTS

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Brief introduction of metabonomics</b> .....	1
<b>1.2 Applications of NMR in metabonomics</b> .....	2
<b>1.3 Structure of this dissertation</b> .....	4
<b>Chapter 2 Brief reviews on metabonomics studies of gestational diabetes mellitus</b> .....	9
<b>2.1 Introduction of gestational diabetes mellitus</b> .....	9
<b>2.2 Clinical screening methods for gestational diabetes mellitus</b> .....	9
2.2.1 High risk factors .....	9
2.2.2 Screening time .....	10
2.2.3 Screening methods .....	10
2.2.4 Diagnostic criteria .....	11
2.2.5 Shortcomings of current screening methods .....	11
<b>2.3 Metabolomic studies of gestational diabetes mellitus</b> .....	12
2.3.1 Metabolic profiling analysis of serum .....	13
2.3.2 Metabolic profiling analysis of urine .....	15
2.3.3 Metabolic profiling analysis of amniotic fluid .....	17
2.3.4 Metabolic profiling analysis of placenta .....	18
2.3.5 Effect of diet on metabolic profiling .....	19
2.3.6 Potential disturbed metabolic pathways .....	20
<b>2.4 Potential advantages of metabonomics in GDM diagnostics</b> .....	21
<b>2.5 Conclusions</b> .....	22

<b>Chapter 3 <math>^1\text{H}</math> NMR metabolic profiling analysis of gestational diabetes mellitus biofluid</b> .....	29
<b>3.1 Materials and methods</b> .....	29
3.1.1 Sample collection.....	29
3.1.2 Sample preparation and $^1\text{H}$ NMR experiment .....	29
3.1.3 NMR data preprocessing.....	31
<b>3.2 Experimental results</b> .....	32
3.2.1 Analysis of serum .....	32
3.2.2 Analysis of urine .....	38
<b>3.3 Conclusions</b> .....	44
<b>Chapter 4 Summary and prospect</b> .....	53
<b>4.1 Summary</b> .....	53
<b>4.2 Prospect</b> .....	53
<b>Publication list</b> .....	57
<b>Acknowledgements</b> .....	58

## 摘 要

代谢组学是 20 世纪 90 年代末期发展起来的一门新兴学科，它借助高通量、高灵敏度的现代分析技术，分析生物体中内源性代谢物的整体组成，并通过跟踪代谢物复杂、动态的变化，辨识和解析被研究对象的生理病理状态。

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是糖尿病的一种独立类型，是在妊娠期特发的代谢性疾病。本文将基于核磁共振(NMR)的代谢组学方法应用于 GDM 的研究中，分析 GDM 志愿者和健康孕妇志愿者的血清和尿液中小分子代谢物的差异，探索 GDM 的生物标记物和受损代谢通路，为 GDM 的病理机制研究提供新的科学依据。本文的主要内容归纳如下：

首先，详细综述了代谢组学方法在 GDM 研究中的应用，总结并列举了代谢组学在 GDM 研究中的优势。

其次，应用  $^1\text{H}$  NMR 分析了 GDM 患者和健康孕妇血清和尿液的代谢轮廓，并结合多元统计分析发现：GDM 患者的血清中葡萄糖、氧化三甲胺、琥珀酸和甘氨酸等代谢物含量明显升高；尿液中甘氨酸、二甲基甘氨酸、尿黑酸、N-甲基-烟酰胺 (N-methylnicotinamide, NMND) 等含量升高，而丙二酸、乙醇胺、苯乙酰谷氨酰胺(phenylacetylglutamine, PAG)、马尿酸、抗坏血酸等含量降低等现象。结果说明 GDM 不仅影响了机体的糖类、脂类和氨基酸的代谢，也导致了能量代谢以及肝肠循环等其他代谢系统的紊乱。尤其到了妊娠期糖尿病晚期，随着胰岛素抵抗作用增强，物质和能量的代谢也逐步增强，导致机体代谢进一步失衡，加重肝肾的负担，从而引起肝肾功能失调。

基于 NMR 的代谢组学分析方法为探讨 GDM 的病理机制提供一个很好的技术平台，并将在 GDM 的早期诊断和个体化治疗等方面的研究具有广阔的应用前景。

**关键词：**基于 NMR 的代谢组学；妊娠期糖尿病(GDM)；多元统计分析

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## ABSTRACT

Metabonomics is termed as the qualitative and quantitative measurement of the dynamic multi-parametric metabolic response of a living system to pathophysiological stimuli or genetic modification. Gestational diabetes mellitus (GDM) is a separate type of metabolic disease, only during pregnancy. The traditional diagnostic methods of GDM exist misdiagnosis and other shortcomings. In this paper, The NMR-based metabonomics is applied to GDM studies. By systematically analyzing the difference of the small molecular metabolites in serum and urine, induced by GDM, the related biomarkers and metabolic pathways could be derived, and our result could provide a scientific basis for the early diagnosis and treatment of GDM. The main contents of this study are as follows:

Firstly, the application of metabonomics in GDM was summarized in detail, and the advantages of metabonomics in GDM study were listed.

Further, high resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis, was applied to investigate metabolic profilings of serum and urine from GDM patients. Results showed that the serum from GDM patients were highlighted by the increased level of glucose, TMAO, succinate and glycine, while elevated glycine, dimethylglycine, homogentisate, N-methylnicotinamide (NMND) and declined malonate, ethanolamine, phenylacetylglutamine(PAG) and hippurate were identified in urine. These metabolites were analyzed detailedly based on metabolite pathway database. Studies showed that carbohydrates, lipids and amino acid metabolism are disturbed by GDM, and the enterohepatic circulation system and other metabolic disorders are also affected. Particularly in the later period of GDM, with the enhancement effect of insulin resistance and the increasing physiological needs of mother and fetus, energy metabolism is enhanced quickly in pregnant women, and the body's metabolic balance was disturbed. In addition, as liver and kidney are important material transformation and excretion organs, the rapid metabolite changes of pregnant women may exacerbate the burden of liver and kidney, even result in the lesions of liver and kidney.

Results have shown that the NMR-based metabonomics approach provides a robust technical platform to study the pathomechanism on GDM, and will have broad application prospects in early diagnosis and individual therapy of GDM in the future.

**Keywords:** NMR-based Metabonomics; Gestational Diabetes Mellitus; Multivariate Statistical Analysis

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 第一章 绪 论

## 1.1 代谢组学简介

代谢是生命活动中所有（生物）化学变化的总称。这些反应进程使得生物体能够生长、繁殖，并保持它们的结构以及对外界环境做出反应。随着高通量、高灵敏度的现代分析技术的发展，以生物体代谢信息为研究对象的代谢组学应运而生。代谢组学是定量或定性考察生命系统由于受到外源性刺激或者基因修饰而产生的与时间相关的多参数代谢应答的一门新兴学科<sup>[1,2]</sup>，是继基因组学、转录组学和蛋白质组学后系统生物学的另一重要研究领域。

代谢组学的历史最早可以追溯到 20 世纪 70~80 年代，主要来源于 Devaux 等人提出的代谢轮廓(metabolic profiling)分析<sup>[3]</sup>。1985 年，英国帝国理工学院的 Nicholson 研究小组利用核磁共振技术对大鼠尿液进行分析，发现了尿液代谢物的变化与病理的关系<sup>[4]</sup>。1986 年，Journal of Chromatography A 出版了一期关于代谢轮廓的专辑。1999 年，Nicholson 等人正式提出了 metabonomics(代谢组学)的概念，此后该小组在动物体生理、药物毒理、分子表型学、疾病诊断等方面做了大量探索性的工作<sup>[5-10]</sup>。2002 年，德国 Max-Planck 研究所的 Oliver Fiehn 在植物代谢分析的基础上提出了 metabolomics(代谢组学)的概念，并在植物代谢领域做了大量工作<sup>[11]</sup>。2005 年，SpringerLink 出版社创立了名为“Metabolomics”的杂志，标志着代谢组学正式进入了全面发展的阶段。

代谢组学已引起各国研究者，特别是生物医学研究者的极大兴趣，短短十几年取得了突飞猛进的发展。从研究论文的数量上看，我们以“代谢组学”为关键词在 CNKI 期刊网数据库上检索发现：从 2002 年仅有少数几篇代谢组学的综述文章开始，研究论文数量逐年呈指数增加，至 2014 年已达到 1300 篇之多。此外，以"metabo?omic\*"为关键词在 Web of Science 数据库中进行检索，发现论文数量从 1999 年的 1 篇，快速增长到 2014 年的 8400 多篇(图 1.1)。其中不乏 Science、Nature、PNAS 等杂志的高水平文章。代谢组学所涉及的研究领域主要在生物医学领域，尤其是疾病诊断、新药开发、药物作用、毒理机制研究。此外，代谢组

学在植物和微生物的研究领域也得到了广泛的应用。

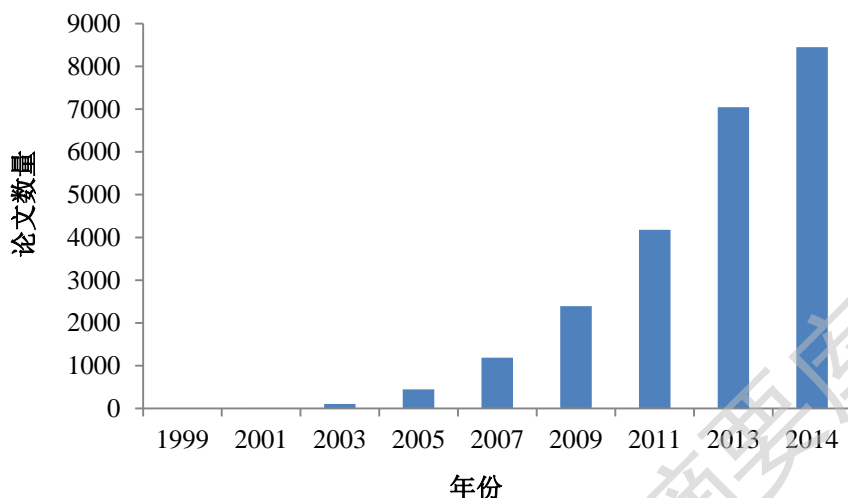


图 1.1 Web of Science 数据库中代谢组学相关论文的数量

## 1.2 核磁共振技术及其在代谢组学中的应用

代谢组学的常用分析技术包括:核磁共振(NMR)、质谱(MS)、气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、以及气质联用(GC/MS)和液质联用(LC/MS)等等<sup>[12-14]</sup>。其中, NMR 技术以其具有重现性好、无偏向性、无损伤性、便于确定未知代谢物质的结构和性质,可以对细胞和组织等进行原位的、无创的、动态的检测等优点,一直是代谢组学研究领域最主要的分析技术之一。以 NMR 为主要分析技术的代谢组学研究已发展成一个相对独立的分支,即基于 NMR 的代谢组学,并广泛地应用到分子病理学、药理学、毒理学、临床医学和环境科学等重要的领域<sup>[15-21]</sup>。

与其它分析技术相比, NMR 具有如下特点<sup>[22,23]</sup>: 1. 样品的预处理简单; 2. NMR 具有无损伤性,不破坏样品的结构和性质; 3. 可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件,能够在接近生理条件下进行实验; 4. 样品的 NMR 检测可以在很短的时间内完成(大致 5~10 分钟),这对实现大批量样品检测以及保证样品在检测期内维持原有的生化性质至关重要; 5. NMR 技术灵活多变,通过设置脉冲序列就可以获得样品中不同官能团的分子信息。

基于NMR的代谢组学通常包含以下几个步骤(如图1.2所示):

一、根据生物学问题设计研究方案以及样本采集和处理方法<sup>[24,25]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库