

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520081153445

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于 NMR 的代谢组学应用于糖尿病微血管病
变特征代谢物的分析

Analysis of Characteristic Metabolites in Diabetic
Microvascular Complications Using NMR-based
Metabonomics

张志军

指导教师姓名: 马红 副教授

专业名称: 内科学(内分泌与代谢病)

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

基于 NMR 的代谢组学

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

摘要

近年来糖尿病已经逐渐成为我国的常见病之一，相关的微血管并发症如糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变的发病率正逐年升高，给社会和家庭带来了沉重的负担。糖尿病微血管病变起病隐匿、进展缓慢，往往出现相关症状的时候，已经发展到中期甚至晚期。糖尿病和相关的微血管病变是多因素参与的整体代谢性紊乱，其调控机制十分复杂。以前的研究主要是利用分子生物学和生物化学等方法，通过检测单个或少数几个成分的变化来获得疾病的相关信息，忽略了整体器官中动态的代谢变化，很难了解体内的整体紊乱，也无法做到对微血管病变的早期预警。代谢组学方法是从系统的角度整体地研究人体对内外环境改变的调节和应答，能够为糖尿病微血管病变的代谢研究提供良好的技术平台。

核磁共振（nuclear magnetic resonance, NMR）技术作为一种非侵入和高效的检测手段，是代谢组学普遍采用的方法，广泛应用于生物体液的研究。本文将基于 NMR 的代谢组学方法应用于糖尿病体液特征代谢物的寻找，微血管病变相关特征代谢物的筛选，用以探讨采用该方法探索微血管病机制及早期诊断的可行性。主要包括：

1. 利用基于 NMR 代谢组学方法研究糖尿病。分别获得 2 型糖尿病患者和正常人的血清、尿液的 NMR 谱，结合偏最小二乘判别分析法（Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA）的模式识别分析方法，发现牛磺酸、丙氨酸、柠檬酸、乳酸、甲基丙二酸、乙酸等可能为 2 型糖尿病的可能特征代谢物。

2. 运用基于 NMR 代谢组学方法研究糖尿病微血管病变。分别获得 2 型糖尿病和 2 型糖尿病合并微血管病变患者的血清、尿液的 NMR 谱，结合 PLS-DA 模式识别分析方法，其中血清标本无法明显区分，主要原因为组内个体差异过大；尿液中发现乙酸、乳酸、三甲胺为微血管病变的可能特征代谢物。

3. 通过有序逻辑回归分析方法对糖尿病临床上常见的生化资料进行分析，发现高血压和病程是糖尿病微血管病变的危险因素，而 C 肽水平与微血管病变的有明显的相关性。

关键词：糖尿病；微血管病变；代谢组学；NMR；特征代谢物；有序逻辑回归

Abstract

Diabetes mellitus (DM) has become one of the most common illness in china, the incidence of diabetic microangiopathy such as diabetic nephropathy (DN), diabetic retinopathy(DR) increased year by year, and put a heavy burden on society. DM and Diabetic microangiopathy (DMAP) involves in overall metabolic disturbance with multi-factor participation, the regulation mechanism is complex. The past research methods on DMAP mainly based on the application of molecular biology and biochemistry, they obtained relevant information through variation of single or several composition, but ignoring dynamic metabolic changes of organ in the overall, and difficult to realize the integrated disorder in vivo and achieve early warning of DMAP.

As a non-invasive and efficient means of detection, nuclear magnetic resonance (NMR) technology is the commonly used metabonomic methods. The NMR-based metabonomic approach has been widely used in biofluids research. The aim of this paper is to find characteristic metabolites of DM and DMAP, and explore the possibility of methods used in mechanism and early diagnosis of DMAP research. The main contents of this study are as follows:

First, by NMR-based metabonomic approach , obtaining NMR spectrum of blood, urine from type 2 diabetes mellitus(T2DM)and normal; searching characteristic metabolites with partial least squares discriminant analysis(PLS-DA)pattern recognition analysis, and found that taurine, alanine, citrate, lactate, methylmalonate, acetate etc are potential characteristic metabolites of T2DM, analyse the potential mechanism of diabetic metabolic disturbance and diabetic complications.

Second, by NMR-based metabonomic approach , obtaining NMR spectrum of blood, urine from T2DM and T2DM with microangiopathy; finding characteristic metabolites of DMAP with PLS-DA pattern recognition analysis. Serum samples could not be discriminated due to individual variation in the ground; in urine samples

we found acetate, lactate, trimethylamine(TMA) are potential characteristic metabolites of DMAP. Our study have lay a foundation for future research on DMAP.

Third, to analyse the clinical materials of DM by ordinal logistic regression analysis, found that course of the diabetes, hypertension were independent risk factors on DMAP, and fasting plasma C-peptide wss significantly correlations with diabetic microvascular complications. These conclusions could provide reference for clinical prevention and treatment of DMAP.

Keywords: diabetes; microangiopathy; metabonomics; NMR; characteristic metabolites; ordinal logistic regression

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 前言	1
1.1 糖尿病	1
1.1.1 流行病学	1
1.1.2 糖尿病微血管并发症	1
1.2 基于核磁共振的代谢组学	2
1.2.1 代谢组学简介	2
1.2.2 代谢组学的研究方法简介	4
1.2.3 本实验所运用的基于 NMR 技术的代谢组学研究方法简介	6
1.3 本文的主要内容	7
参考文献	9
第二章 正常人及 2 型糖尿病患者体液代谢组学分析	12
2.1 材料与方法	12
2.1.1 入选标准	12
2.1.2 样品采集	12
2.1.3 NMR 制谱	12
2.1.4 数据预处理	13
2.1.5 多元统计分析	13
2.2 实验结果	13
2.2.1 NMR 谱图分析	13
2.2.2 NMR 谱图模式识别分析	15
2.3 讨论	20
2.4 本章小结	25
参考文献	26

第三章 2 型糖尿病及 2 型糖尿病合并微血管病变患者体液代谢组学分析	29
3.1 材料与方法	29
3.1.1 入选标准	29
3.1.2 样品采集	29
3.1.3 NMR 制谱	30
3.1.4 数据预处理	30
3.1.5 多元统计分析	31
3.2 实验结果	31
3.2.1 NMR 谱图分析	31
3.2.2 NMR 谱图模式识别分析	32
3.3 讨论	36
3.4 本章小结	38
参考文献	39
第四章 2 型糖尿病微血管并发症相关因素的有序逻辑回归分析 ...41	41
4.1 材料与方法	41
4.1.1 研究对象	41
4.1.2 检测方法	41
4.1.3 相关疾病临床诊断标准	42
4.1.4 统计学处理	42
4.2 结果	43
4.3 讨论	46
4.4 本章小结	48
参考文献	49
第五章 总结与展望	51
5.1 本文总结	51
5.2 今后研究方向	51
文献综述	54

参考文献	62
致 谢	66

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Epidemiology	1
1.1.2 Diabetic microvascular complications.....	1
1.2 Metabonomics based on NMR	2
1.2.1 Introduction of metabonomics.....	2
1.2.2 Introduction of reserch method on metabonomics	4
1.2.3 Introduction of reserch method on NMR-based metabonomics in our study	6
1.3 Main works of the thesis	7
References	9
Chapter 2 Metabonomics analysis of normal/T2DM biofluids	12
2.1 Material and methods	12
2.1.1 Inclusion criteria.....	12
2.1.2 Samples collection.....	12
2.1.3 NMR scanner.....	12
2.1.4 Data processing.....	13
2.1.5 Multivariate statistics analysis.....	13
2.2 Results	13
2.2.1 NMR spectra analysis.....	13
2.2.2 NMR spectra pattern recognition analysis.....	15
2.3 Discussions	20
2.4 Conclusions	25
References	26

Chapter 3 Metabonomics analysis of T2DM/T2DM with microangiopathy biofluids	29
3.1 Material and methods	29
3.1.1 Inclusion criteria	29
3.1.2 Samples collection	29
3.1.3 NMR scanner	30
3.1.4 Data processing	30
3.1.5 Multivariate statistics analysis	31
3.2 Results	31
3.2.1 NMR spectra analysis	31
3.2.2 NMR spectra pattern recognition analysis	32
3.3 Discussions	36
3.4 Conclusions	38
References	39
Chapter 4 Ordinal logistic regression analysis of relevant factors on diabetic microvascular complications in T2DM	41
4.1 Material and methods	41
4.1.1 Research objects	41
4.1.2 Measure methods	41
4.1.3 Relevalt diseases diagnostic criteria	42
4.1.4 Statistics processing	42
4.2 Results	43
4.3 Discussions	46
4.4 Conclusions	48
References	49
Chapter 5 Summary and prospects	51
5.1 Summary	51
5.2 Prospects	51

Review	54
References.....	62
Acknowledgement.....	66

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 糖尿病

1.1.1 流行病学

根据国际糖尿病联盟（international diabetes federation, IDF）统计,20世纪90年代,全球糖尿病患者约为1亿人,到2007年,该数字已经迅速增长到2.46亿人,占全球20岁以上成人的6%。预计到2025年,全球将有约4亿人受到糖尿病的困扰,患病率达到7.3%,发展中国家糖尿病患者占75%以上。

当今我国快节奏的生活方式、高热量饮食以及缺乏足够的运动令糖尿病迅速成为流行病,根据我国杨文英教授在新英格兰医学杂志报道^[1],中国糖尿病发病率为9.7%,达到9240万人,糖耐量异常(的发病率为15.5%,将近1亿5千万人,如无实施有效的生活干预或药物治疗,很可能在未来逐步发展为2型糖尿病。糖尿病目前已经成为我国公共卫生系统的一大挑战。因此,对糖尿病及其相关并发症的防治,成为一项刻不容缓的任务。

1.1.2 糖尿病微血管并发症

糖尿病对健康带来的不良后果并不局限于血糖失控所引发的急性并发症,主要还涉及微血管、大血管及神经系统等系统慢性并发症。有报道显示,糖尿病慢性并发症的发病率随着糖尿病病程的延长而上升,糖尿病发病后10年有30%-40%的患者至少会发生一种慢性并发症^[2]。一般认为糖尿病慢性并发症只在病程很长的糖尿病患者中发生,然而贾伟平在上海进行糖尿病及糖尿病慢性并发症流行病学调查结果显示,新诊断糖尿病人群的视网膜病变、肾脏病变、周围神经病变患病率分别为12.9%、20.0%和25.3%,而在糖尿病前期人群中上述慢性并发症的患病率分别为8.0%、10.5%和24.6%,提示糖尿病的慢性微血管并发症可以出现在糖尿病自然病程的早期阶段^[3]。同时国外的报道也指出,在糖调节受损(impaired glucose regulation, IGR)阶段已经存在糖尿病微血管并发症,主要包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病周围神经病变^[4]。许文琼^[5]等对846例2型糖尿病患者的慢性并发症进行回顾性分析发现,在大血管、微血管、神经病变及糖尿病足这几种主要并发症中,以糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)及糖尿病

肾病(diabetic nephropathy, DN)的发病率最高,分别为28.5%、27.7%,且病程在10年以上的患者基本都同时并发视网膜病变及肾病。这些研究结果提示,糖尿病慢性微血管并发症占据了糖尿病慢性并发症的主要地位,是目前预防及治疗的关键之一。

糖尿病并发症可影响机体的各种器官,包括视网膜、肾脏、心脏、大脑、四肢、神经、动脉、甚至牙周组织等。据统计,在糖尿病致死致残的患者中,各种并发症原因引起的占95%以上,而因为糖尿病本身原因的不足5%。近年随着糖尿病患病率的增加,糖尿病慢性微血管并发症的人数也呈高发趋势。在美国,糖尿病病人发生失明的危险是普通人群的25倍。它是导致25-65岁的工作年龄成年人失明的主要原因,是全球致盲的主要原因之一。在英国,2型糖尿病肾病患者已占终末期肾病患者的30%,而在美国约占45%。糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病已分别成为失明和终末期肾病的主要原因。

糖尿病所引起的慢性微血管并发症不仅成为致残、致死的主要原因,而且造成医疗费用的急剧增长,这给我们的社会医疗、患者家庭都带来了巨大的压力。糖尿病及其并发症不仅是发达国家的重大疾病,而且日益成为发展中国家的巨大负担,它正在侵蚀发展中国家经济发展的成就,导致巨大的人类疾苦和社会灾难。因此,糖尿病慢性并发症成为糖尿病患者的主要危害。虽然近年来对于慢性并发症发生机制研究较多,但具体的发病原因尚不明确,与多种因素相关。

1.2 基于核磁共振的代谢组学

1.2.1 代谢组学简介

近年来,以基因组学、蛋白质组学和代谢组学为代表的系统生物学迅猛发展,研究者逐渐转变传统的研究思路,开始从生物系统的整体性分析入手,探索疾病早期诊断的新途径。从分析代谢物角度出发有针对性地研究疾病的发生、发展及其所引发的一些代谢性疾病病理过程的代谢产物中的共性以及特异性指标,寻找特异性生物标志物,对于疾病及其引发的代谢性疾病发病机制的研究、疾病的早期诊断和预防、以及药物干预评价等将可能产生突破性的成果。

1998年,代谢组(metabolome)这个概念被提出^[6],代谢组指的是“一个细胞、组织或器官中所用代谢组分的集合,尤其指小分子物质。Nicholson等^[7]在1999年提出代谢组学的概念(metabonomics)时将其定义为“在新陈代谢的

动态过程中，系统研究代谢产物的变化规律，揭示机体生命活动代谢本质”。代谢组学 (metabonomics) 对某一生物或细胞所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析的一门新学科。它是通过考察生物体系受刺激或扰动后 (如将某个特定的基因变异或环境变化后) 其代谢产物的变化，或其随时间的变化来研究生物体系的代谢途径的一种技术。其最主要的特征是通过高通量的实验和大规模的计算，从系统生物学的角度出发，全面地综合地考察机体的代谢变化。作为崭新的方法学，代谢组学已成为国际上疾病与健康研究的一个重要热点。目前，代谢组学已经在疾病诊断、药物作用机制研究和安全性评价等方面表现出重要的理论意义和应用价值^[8-10]。

目前在生物医学研究领域，基因组学 (genomics)、蛋白质组学 (proteomics) 与代谢组学等一同构成系统生物学的组学 (-omics) 生物技术基础。不可否认，基因组学和蛋白质组学为我们的科研和应用带来了极大的变化和深刻的影响。基因组学和蛋白质组学分别从基因和蛋白质层面探寻生命的活动，基因组学研究的是生物体受内源性或外源性物质刺激后基因表达的改变。蛋白质组学方法可以对内外源刺激过程所引起的细胞蛋白质组成变化进行半定量的测量。然而，生物机体是一个在动态过程中，多因素综合调控的复杂体系，在从基因调控到生物信息传递链中，机体需要不断的调节自身复杂的代谢网络来维持系统内部以及与外界环境的正常动态平衡。在这一点上，无论是基因组学还是蛋白质组学都不能动态反映生物体的变化过程，也不能对生物整体的应答进行测量。其次，细胞内许多生命活动实际上是发生在代谢物层面的，如细胞信号释放 (cell signaling)，能量传递，细胞间通信等都是受代谢物调控的。代谢组学正是研究代谢组在某一时刻细胞内所有代谢物的集合的一门学科。而且代谢组学的优势就在于它是研究生物体系受外部刺激或内部基因改变所产生的所有动态代谢产物的变化，更多地反映了细胞所处的环境，与细胞所处外界因素的影响密切相关。因此有人形象地描述，“基因组学和蛋白质组学告诉你什么可能会发生，而代谢组学则告诉你什么确实发生了。”

1.2.2 代谢组学的研究方法简介

代谢组学的研究方法依赖于分析化学中的各种谱学技术，高效液相色谱、质谱、磁共振波谱、红外光谱、库仑分析、紫外可见光谱、荧光散射、放射性检

测、光散射等分离分析手段及其组合都可应用于代谢组学的研究中。其中，核磁共振技术特别是氢谱以其对含氢代谢产物的普适性，色谱以其高分离度、高通量，质谱以其普适性、高灵敏性和特异性而成为最主要的分析工具。质谱分析是一种测量离子荷质比（电荷-质量比）的分析方法，其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离，生成不同荷质比的带正电荷的离子，经加速电场的作用，形成离子束，进入质量分析器。在质量分析器中，再利用电场和磁场使发生相反的速度色散，将它们分别聚焦而得到质谱图，从而确定其质量。目前质谱分析法已广泛地应用于化学、化工、材料、环境、地质、能源、药物、刑侦、生命科学、运动医学等各个领域。色谱法又称“色谱分析”、“色谱分析法”、“层析法”，是一种分离和分析方法，在分析化学、有机化学、生物化学等领域有着非常广泛的应用。色谱法利用不同物质在不同相态的选择性分配，以流动相对固定相中的混合物进行洗脱，混合物中不同的物质会以不同的速度沿固定相移动，最终达到分离的效果。而核磁共振是处于静磁场中的原子核在另一交变磁场作用下发生的物理现象。通常人们所说的核磁共振指的是利用核磁共振现象获取分子结构、人体内部结构信息的技术。并不是所有原子核都能产生这种现象，原子核能产生核磁共振现象是因为具有核自旋。原子核自旋产生磁矩，当核磁矩处于静止外磁场中时产生进动核和能级分裂。在交变磁场作用下，自旋核会吸收特定频率的电磁波，从较低的能级跃迁到较高能级。这种过程就是核磁共振。与质谱和色谱相比，NMR的缺点是灵敏度较低，但其优点也是非常明显的。NMR的优势在于所检测样品无需繁琐的预处理，就能够对样品实现简单性、无创性、无偏向的检测，NMR对所有化合物的灵敏度是一样的，具有好的客观性和重现性，既可在接近生理条件下进行实验，又可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件；NMR可以进行实时和动态的检测，并可设计多种编辑手段，实验方法灵活多样。因此，NMR技术是代谢组学最普遍采用的方法。NMR作为一种非侵入和高效的检测手段已成为当今化学、生物学和医学研究等领域的一种强有力的工具。英国Nicholson教授及其同事等人在长期研究生物体液的基础上提出了基于NMR的代谢组学^[8]，基于NMR代谢组学的概念自提出以来，引起了各国科学家的极大兴趣，现已应用于包括疾病的诊断、药物作用机制研究、药物研发、分子生理学、分子病理学、基因功能组学、营养学、环境科学等重要领域^[9, 11, 12]。

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库