

· 基金项目纵览 ·

基于NMR技术对Wilson病模型大鼠血清代谢组学研究

蒋怀周^{1,2,3}, 鲍远程², 刘兰林⁴, 危阳洋^{5,6}, 董继扬⁶, 吕晓英⁷

(1. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061; 2. 安徽省中医院神经内一科, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽中医学院国际教育交流学院, 安徽 合肥 230031; 4. 安徽中医学院中医临床学院, 安徽 合肥 230031; 5. 厦门大学生物材料系, 生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005; 6. 厦门大学物理系, 福建省等离子体与核磁共振研究重点实验室, 福建 厦门 361005; 7. 安徽省中医院实验中心, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的: 以基于核磁共振(NMR)的代谢组学方法对Wilson病大鼠模型及正常对照组大鼠血清进行研究, 分析血清中小分子代谢物的变化, 从小分子代谢物层面上探讨Wilson病的内在机制, 以更加清楚的认识本病。方法: 22只雄性Wistar大鼠, 体重(180±20)g, 随机被分为模型组(n=11)和健康对照组(n=11), 采用铜负荷法制作Wilson病大鼠模型, 以核磁共振(NMR)技术对大鼠血清进行检测。采用MestRe-C 2.3软件及自编软件对谱图进行手动调相、基线校正和谱峰对齐。对样品进行分段积分, 将积分数据归一化后构成数据矩阵, 并利用PCA方法对数据矩阵进行统计分析。结果: 相对于正常对照组, 模型组大鼠血清甜菜碱(betaine)、氧化三甲胺(TAMO)、低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、葡萄糖(glucose)含量有显著降低, 胆碱(choline)、胆碱磷酸(phosphorylcholine)的含量有所降低, 乳酸(lactate)、谷氨酰胺(glutamine)、糖蛋白(glycoprotein)有显著升高, 肌氨酸+肌氨酸酐(creatinine+ creatinine), 精氨酸(arginine)有所升高。这些发生改变的代谢物可以作为WD的小分子代谢标志物, 为进一步研究WD的内在代谢机制提供参考。

关键词: Wilson病; 代谢组学; 核磁共振; 血清; 小分子代谢物

中图分类号: R122.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-842X(2010)09-0019-04

¹H-NMR Spectroscopy-based Metabonomic Research on Serum of Model Rats of Wilson's DiseaseJIANG Huai-zhou^{1,2,3}, BAO Yuan-cheng², LIU Lan-lin⁴,
WEI Yang-yang^{5,6}, DONG Ji-yang⁶, LU Xiao-ying⁷

(1. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China; 2. The First Department of Neurology, Anhui Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China; 3. School of International Education & Exchange, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China; 5. Department of Biology Materials and Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 6. Department of Physics, Xiamen University, Fujian Province Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Xiamen 361005, Fujian, China; 7. Center of Research, Anhui Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China)

Abstract: *Objective:* Applying ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy-based metabonomic approach to investigate the changes of small molecular metabolites in the serum from the rats of the model group of Wilson's disease contrasted with those of the control group. Exploring the pathogenesis of Wilson's disease from small molecular aspect. *Methods:* 22 male Wistar rats [weight = (180 ± 20) g] were divided into two groups randomly, the model group (n=11) and the control group (n=11), with the models established with excessive copper method. The serum was tested with ¹H-NMR technology. The spectra were edited with MestRe-C2.3 and self-programmed software and then principal component analysis (PCA) was applied to differentiate the two groups. *Results:* Choline and phosphorylcholine concentrations were found to be lower and TAMO+betaine, LDL, VLDL and glucose were significantly lower in the serum of the model group. While creatinine and arginine concentrations were found to be higher and lactate, glutamine and glycoprotein were significantly higher in the model group. The small molecular metabolites above may contribute to the discrimination, and serve as references for further research on WD pathogenesis.

Key words: Wilson's disease; metabonomics; nuclear magnetic resonance; serum; small molecular metabolite

Wilson病(Wilson's Disease, WD), 又称肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD), 是一种与铜代谢障碍有关的常染色体隐性遗传病。由于铜

代谢障碍, 铜沉积于大脑基底节、肝脏、肾脏等处, 导致各种症状, 包括锥体外系症状、急性和慢性肝功能损害及肾功能损害等。不同地区及人群的患病率不

收稿日期: 2010-03-16

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划分课题重大疑难疾病中医防治研究项目(2006BA104A02)

作者简介: 蒋怀周(1978-), 女, 安徽亳州人, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 中医内科学。

通讯作者: 鲍远程(1945-), 男, 安徽六安人, 教授、主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合诊治神经内科疾病。

E-mail: baoyuancheng68@sina.com.cn。

一,估计世界人群的患病率为0.5~3/10万^[1-2],我国较多见。

WD虽然都是因为铜代谢障碍而引起,但是临床表现却各异:有的患者表现以锥体外系症状为主,有的以两下肢对称性痉挛截瘫为特征,有的以佝偻病样骨骼改变和肌病样表现为主,还有的以肝脏症状为主。一直以来,对于WD的研究主要以分子生物学、蛋白质、生物化学和病理为主。然而,对于这些临床表现各异的症状原因及病理,医学上至今没有一个合理的解释。

本课题所应用的代谢组学研究方法是一门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的科学。生物体受外源性物质刺激或基因变异所导致的病理变化过程中,必然影响生物代谢网络,使得细胞产生的内源性物质的种类、浓度或相对比例发生改变,这种改变最终体现在血浆、尿液等生物体液中分子集合轮廓的改变上,利用多种谱学技术建立代谢物指纹图谱来表达这种改变,并利用化学计量学的方法挖掘这些谱间隐含的信息,可从系统生物学的代谢组学角度阐明疾病的微观本质^[3-4]。目前,尚未见应用NMR代谢组学的方法来研究WD的文献报道。

本实验以基于核磁共振(NMR)的代谢组学方法对Wilson病模型大鼠及正常对照组大鼠的血清进行研究,第一次从小分子代谢物层面上认识本病,并发现了一些小分子代谢物的异常,可能作为WD小分子代谢标志物,为从整体的、系统的代谢水平探讨本病提供了新的思路。

1 材料和方法

(1)动物、试剂和仪器:健康成年Wistar大鼠,雄性,体重(180±20)g,SPF级,由安徽医科大学提供,室温为25℃环境饲养。重水(deuterium oxide/D₂O)为美国CILantro公司产品;Varian NMR System 500 MHz超导NMR谱仪购自美国瓦立安公司。

(2)造模方法:将动物随机分为Wilson病模型组(n=11)和正常对照组(n=11),正常对照组自由摄食饮水,WD模型组在适应性饲养1周后采用铜负荷造模^[5],喂饲含硫酸铜1g/kg的饲料和0.185%的硫酸铜水8周。造模结束前1天,将大鼠置于代谢笼留取24h尿液,摇匀后准确量出尿液体积,测定时取2mL尿液加0.1mL H₂SO₄混匀待测,采用原子吸收分光光度计测量、火焰法测定尿铜含量以判断造模情况。

(3)取材及处理:结束造模后,第2天清晨8时,将正常对照组大鼠及WD造模成功大鼠用戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射进行深度麻醉,从腹主动脉采血,3000r/min离心10min取血清,置于-80℃冰箱中保存备用。

(4)NMR数据采集:在厦门大学核磁共振实验室进行检测血清样品时,取500μL血清与250μL磷酸盐缓冲液(0.2mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH=7.4, D₂O, 99.9% D)混合,以消除pH变化对化学位移的影响,并加入适量的DSS(2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid)作为化学位移零点的

定标。配好后移入5mm样品管,在Varian NMR System 500MHz谱仪上采集样品的一维¹H NMR谱。实验采用5mm HCN 三共振探头,温度300K,谱宽5kHz,信号累加256次,采用NOEPR-CPMG(NOEPR, Nuclear Overhauser Effect spectroscopy with PResaturation; CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence)脉冲序列进行数据采集,其中预饱和模块用于抑制水峰信号,自旋回波模块用于抑制由蛋白和脂蛋白等物质产生的宽峰。

2 结果

2.1 原子分光光度计测定铜离子的结果

健康对照组24h尿铜分别为:39.80、38.33、38.81、25.75、29.02、47.05、29.03、37.12、46.11、38.04、37.78 μg/24h。

WD模型组24h尿铜为:100.21、112.38、152.38、125.21、180.11、137.37、160.13、188.42、187.37、201.21、180.34 μg/24h。

2.2 两组动物血清¹H NMR谱图

见图1。

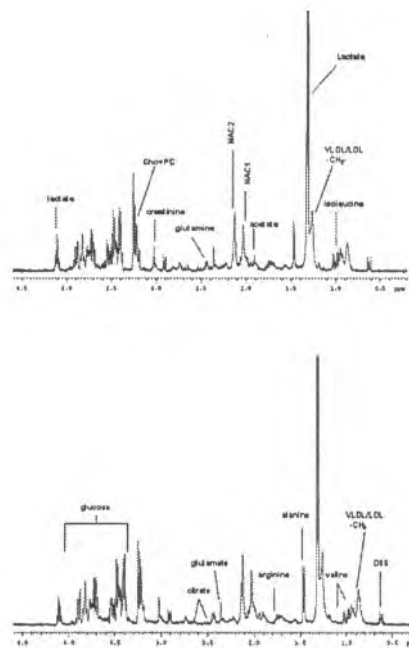


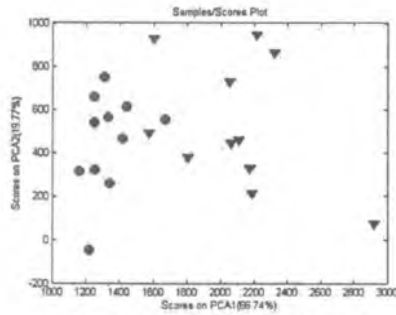
图1 两组动物血清的典型¹H NMR谱图

2.3 谱图预处理

采用MestRe-C 2.3软件(<http://qobruue.usc.es/jsigroup/MestRe-C>)及自编软件对谱图进行手动调相、基线校正和谱峰对齐。对δ 0.2~4.6区域按Δδ=0.02等间隔分段积分,将积分数据归一化后构成数据矩阵,并利用PCA方法对数据矩阵进行统计分析,得到了模型组大鼠与健康对照组大鼠血清的PCA得分图,如图2所示。

在PCA图2中,正常组和模型组可以很好的分开,同时还可以看出,WD模型组的11个样本相对比较分散,这可能是由于WD鼠的个体差异造成的。

为了进一步分析正常组和WD组类别差异的特征峰,找出WD的特征代谢物,笔者给出正常组和WD组PCA负载图,如图3所示。



注：(●)为对照组，(▼)为WD组。

图2 正常鼠与WD模型鼠的PCA得分图

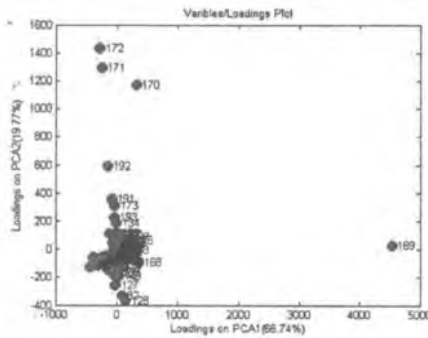
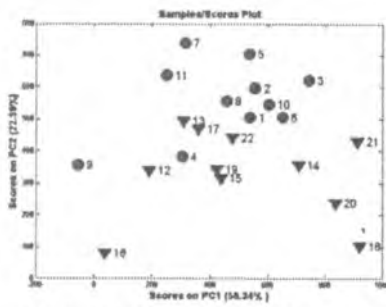


图3 正常组与WD组大鼠血清PCA负载图

在图3中,169这个谱峰段代表的是乳酸(lactae),它对分类的贡献最大,把其它代谢物对分类的贡献给掩盖了。在WD模型组,乳酸的含量显著升高,其原因有可能是大鼠肝损伤时,乳酸循环障碍导致乳酸堆积。接下来,在数据处理中,笔者除去169(表示lactate)后再做PCA分析,以寻找更多的特征性的代谢物。除去169后,PCA的得分图和负载图分别如图4~5。



注：(●)为对照组，(▼)为WD组。

图4 删除乳酸后 正常鼠与WD模型鼠的PCA得分图

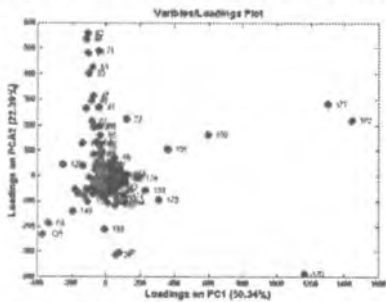


图5 删除乳酸后 正常组与WD组大鼠血清PCA负载图

在得分图上,蓝色的点表示正常组的大鼠,红色的点表示WD模型组的大鼠,可以明显的看到,正常组和模型组依然能够明显的区分开。结合负载图,

我们找到了一些对分类贡献较大的代谢物,这些既可能是WD的特征代谢物,将这些可能特征代谢物列在表1中。

表1 60天对照组-模型组血液中的特征代谢物分析

代谢物	化学位移	变化
乳酸(lactate)	1.32,4.10	↑↑
糖蛋白(glycoprotein)	2.04	↑↑
谷氨酰胺(glutamine)	2.12	↑↑
肌氨酸+肌氨酸酐(creatinine+ creatinine)	3.04	↑
精氨酸(arginine)	1.64,1.71	↑
葡萄糖(glucose)	3.23~3.80	↓↓
甜菜碱(TMAO+ betaine)	3.25	↓↓
脂质Lipid(VLDL/LDL)	1.29~1.30	↓↓
胆碱(choline)	3.19	↓
胆碱磷酸(phosphoryl-choline)	3.21	↓

3 讨论

WD已明确属常染色体隐性遗传性铜代谢障碍,造成铜在组织中过度堆积而引起。正常人日常饮食所摄入的铜为1~2mg/d,全身铜总量约50~250mg。自肠道吸收的铜在血中与白蛋白疏松结合并进入肝脏,其中一部分铜由胆管排泄至肠道由大便排出,另有少量的铜从尿中排出。这种与白蛋白疏松结合的铜部分可继续在血液中变成与组氨酸相结合的“直接反应铜”,正常人中直接反应铜仅占血中总铜的2%~5%,约95%~98%的铜则由白蛋白结合转而与 α_2 球蛋白牢固的结合形成铜蓝蛋白(“间接反应铜”)。本病患者血清中铜蓝蛋白的量远较正常人为少,而直接反应铜则远较正常人为多。因直接反应铜中的铜易于游离,过量的游离铜可沉积于组织或由尿排出。大量的铜主要沉积在肝、脑、肾、角膜及皮肤,组织中过量的铜可影响各种重要酶的活性,氧自由基的增多可引起染色体DNA受损和细胞坏死,直接损害组织器官,导致功能异常。切片镜检可见金褐色或绿褐色铜颗粒沉积于肝脏,可则使肝细胞变性坏死,继之纤维化,质地坚硬,表面有结节,形成结节性肝硬化,门静脉压力增高,致使脾脏可充血肿大。病理上也可见铜沉积于脑,主要损害豆状核和尾状核,并可广泛累及大脑皮质,使神经元变性和数量减少,星形细胞显著增生,局部发生软化,甚至形成空洞。

本研究发现,相对于正常对照组,模型组大鼠血清甜菜碱与氧化三甲胺(TAMO+betaine)、低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、葡萄糖(glucose)含量有显著降低,胆碱(choline)、胆碱磷酸(phosphorylcholine)的含量降低,乳酸(lactate)、谷氨酸盐(glutamine)、糖蛋白(glycoprotein)的含量有显著升高,肌氨酸+肌氨酸酐(creatinine),精氨酸(arginine)有所升高。

生物体内,肌氨酸-磷酸肌酸体系对于细胞的能量代谢起着重要的作用。生物体细胞内大部分肌氨酸被肌氨酸激酶磷酸化为磷酸肌酸,这个反应是可逆的而且在保持ATP动态平衡中起到能量缓冲的作用。此外,有2%的肌氨酸及其所产生的磷酸肌酸在没有酶参与的情况下转化为肌氨酸酐。所有的磷酸激酶同工酶都容易被氧化损伤,因为磷酸激酶同工酶在其活性部位都有一个巯基,巯基在氧化还原条件下会使得磷酸激酶同工酶活性受到影响。对于肌酸酐的升高,笔者认为:首先,大鼠体内铜沉积有

可能抑制了磷酸激酶活性,因此,肌氨酸被转换成肌氨酸酐,而不是磷酸肌酸,其次血清肌氨酸酐的升高提示WD铜代谢障碍造成的肾小管损伤和肾毒性^[6]。

氨是含氮化合物分解的有毒产物,尿素是氨的主要排泄形式。肝功能严重受损时,尿素合成障碍,可致血氨增高,称为高血氨症。大量的氨进入脑组织,将脑细胞中的 α -酮戊二酸结合生成谷氨酸,并进一步生成谷氨酰胺。结果,一方面消耗较多的NADH和ATP等能源物质,另一方面消耗大量的 α -酮戊二酸,使三羧酸循环速率降低,影响ATP的生成,使脑组织供能不足;此外,谷氨酰胺是神经递质,能量及神经递质严重缺乏时将影响到脑功能。正常情况下,体内的氨约有80%~90%是在肝脏中合成中性、无毒、水溶性强的尿素,经血液循环运送至肾脏,随尿排出体外。1932年德国学者Hans Krebs和Kurt Henseleit实验发现在精氨酸酶的作用下,精氨酸能够促进尿素的合成,并提出了尿素合成的循环机制。对本次实验中模型组血清中有精氨酸浓度的升高,笔者认为这可能与铜离子对精氨酸酶活性的影响所致。精氨酸酶活性降低的话,精氨酸无法及时水解为尿素,其含量必然会升高,而致使谷氨酰胺的含量增高和脑功能受损。

Taylor-Robinson等^[7]曾报道以基于NMR的代谢组学研究中,与对照组相比,Huntington病患者的谷氨酰胺相对有所增高。而Jenkins等^[8]在对Huntington大鼠模型研究中发现谷氨酰胺有绝对增高。Griffin等^[9]对脊髓小脑共济失调3型(Spinocerebellar ataxia/Machado-Joseph disease, SCA3/MJD)模型大鼠进行代谢组学研究,结果显示,模型组大鼠体内谷氨酰胺有所增高。谷氨酰胺升高这一现象曾被认为普遍发生于一些因CAG三核苷酸重复序列所导致的神经系统疾病中。然而,Mader等^[10]在对同样是由于CAG三核苷酸重复序列所导致的神经系统疾病——Kennedy病的研究中发现,患者并无谷氨酰胺的增高。Mally等^[11]在对帕金森病血清及脑脊液的研究中发现谷氨酰胺含量有所上升。谷氨酰胺的变化和神经退行性疾病之间具体有什么样的联系有待进一步研究给出解释。

铜在体内的吸收代谢和分布可能会增高能量的代谢,目前认为,铜在体内的毒性主要是由于其所产生的一系列氧化还原反应而导致的。线粒体是氧化反应的受损部位。在肝肾细胞中,铜的积聚往往会导致线粒体的死亡和细胞凋亡。当动物体内有铜积聚时,铜能够提高线粒体内部的氧化反应,当此氧化反应超出抗氧化机能时,氧化损伤就发生了,细胞的完整性也会因脂质氧化作用而受损。胆碱和胆碱磷酸是构成膜的主要构成物质,血清中的胆碱和胆碱磷酸以及脂质的降低,提示细胞膜以及膜性结构如线粒体、内质网的脂质代谢受损。在某些情况下,胆碱磷酸的降低程度与细胞凋亡程度成正比。本研究中,胆碱和胆碱磷酸的降低与Alzheimer病的代谢组学研究研究结果相符合^[12]。

实验结果显示葡萄糖降低与乳酸升高。大量铜离子沉积在大鼠肝脏造成了肝损伤,导致乳酸循环障碍,致使乳酸无法在肝脏内通过糖异生转化为血糖,因而造成了大鼠血清中血糖相对降低而乳酸堆积。

甜菜碱在哺乳动物的肝肾中起着维持渗透压

和甲基化的重要催化剂作用,在甲硫氨酸循环中,它将同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸。在哺乳动物的细胞中,胆碱有三种主要的代谢途径:卵磷脂的合成,乙酰胆碱的合成和氧化成甜菜碱。在哺乳动物体内,胆碱氧化成甜菜碱最主要是在肝肾中进行,在肝脏中,大约有60%的胆碱是以这种方式代谢的。铜离子在肝内聚集损伤肝脏,使得在转硫作用反应中起关键作用的酶例如甲硫氨酸腺苷基转移酶(MAT)、甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶等异常,继而引起含硫氨基酸代谢受损,直接影响到甜菜碱的合成,使哺乳动物体内甜菜碱含量减低。

在本实验中,笔者利用基于NMR的方法对正常鼠与WD大鼠血清进行了代谢组学研究,同时标记出引起类别差异的特征代谢物,其中肌酐等代谢物与传统的生化检测结论吻合,更进一步发现了之前未知的特征代谢物,如模型组大鼠血清甜菜碱(betaine)、氧化三甲胺(TAMO)、低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、葡萄糖(glucose)含量有显著降低,胆碱(choline)、胆碱磷酸(phosphorylcholine)有所降低,乳酸(lactate)、谷氨酸盐(glutamine)、糖蛋白(glycoprotein)有显著升高,肌酸酐(creatine+ creatinine)、精氨酸(arginine)有所升高。其中,谷氨酰胺的异常可以为神经退行性病变的研究提供一个数据参考。新的特征代谢物的发现可以帮助更好的探讨和认识WD这种疾病,为以后对本病的研究及其治疗提供一个思路。同时,研究也表明,基于NMR的代谢组学可以较好地用于WD与正常对照的区分,从而获得具有特征性的代谢物,是寻找小分子特征标志物的有效方法,在未来WD的研究方面具有广阔的应用前景。◆

参考文献

- [1] Dedoussis GV, Genechel J, Sialvera TE, et al. Wilson disease: high prevalence in mountainous area of Crete [J]. *Ann Hum Genet*, 2005, 69 (3): 268-274.
- [2] Dhawan A, Ferenci P, Geubel A, et al. Genes and metal: a deadly combination [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2005, 68 (1): 26-32.
- [3] Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu+-ATPase [J]. *Biol Chem*, 2006, 281 (16): 11161-11166.
- [4] Tanzi RE, Petrukin K, Chernov I, et al. The Wilson's disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene [J]. *Nature Genet*, 1993, 5: 334.
- [5] Pulverer B J, Kyriakis J M, Avruch J, et al. Phosphorylation of c-Jun Mediated by MAP Kinases [J]. *Nature*, 1991, 353 (6345): 670-674.
- [6] Gartland K P, Bonner F W, Timbrell J A, et al. Biochemical characterizations of para-aminophenol-induced nephrotoxic lesions in the F344 rat [J]. *Arch Toxicol*, 1989, 63 (2): 97-106.
- [7] Taylor-Robinson SD, Weeks RA, Bryant DJ, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease: evidence in favour of the glutamate excitotoxic theory [J]. *Mov Disord*, 1996, 11: 167-173.
- [8] Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC, et al. 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers [J]. *Neurology*, 1998, 50: 1357-1365.
- [9] J L Griffin, C K Cemal, M A Pook. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3 [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 16: 334-340.
- [10] Mader I, Karitzky J, Klose U, et al. Proton MRS in Kennedy disease: absolute metabolite and macromolecular concentrations [J]. *Magn Reson Imaging*, 2002, 16: 160-167.
- [11] Mally J, Szalai G, Stone TW. Changes in the concentration of amino acids in serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease [J]. *Neurol Sci*, 1997, 151: 159-162.
- [12] Walter A, Korth U, Hilgert M, et al. *Neurobiol J*. *Aging*, 2004, 25: 1299-1303.