

基金项目纵览

DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2014.01.026

基于NMR技术对Wilson病模型大鼠尿液的代谢组学研究

蒋怀周¹, 刘磊², 危阳洋^{3,4}, 董继扬⁴, 蒋昭雨¹, 蒋雨晨⁵

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031; 2. 亳州市人民医院神经内科, 安徽 亳州 236800; 3. 厦门大学生物材料系, 生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005; 4. 厦门大学物理系, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 福建 厦门 361005; 5. 安徽中医药高等专科学校, 安徽 芜湖 241000)

摘要 目的 以基于核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)的代谢组学方法对Wilson病(Wilson's Disease, WD)铜负荷模型大鼠及正常对照组大鼠的尿液进行研究, 分析模型大鼠尿液中代谢物的变化, 继而从小分子层面探讨铜过量对机体的损伤机制, 以更加清楚的认识本病。方法 28只雄性Wistar大鼠, 体重(180±20)g, 随机被分为模型组(n=14)和健康对照组(n=14)。采用铜负荷法制作Wilson病大鼠模型, 以NMR技术对大鼠尿液进行检测。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, 模型组大鼠尿液醋酸盐(acetate)含量有显著升高, 柠檬酸盐(citrate)、苯乙酰甘氨酸(PAG)、琥珀酸盐(succinate)、甲胺(methylamine)、肌氨酸+肌氨酸酐(creatine/creatinine)、丙酮酸盐(pyruvate)、二甲基甘氨酸(DMG)、丙氨酸(alanine)含量有所升高, 胆碱(choline)、牛磺酸(taurine)含量有所降低。这些发生改变的代谢物可能是潜在的WD铜负荷小分子代谢标志物, 可为进一步研究WD的铜过量代谢机制提供参考。

关键词 Wilson病 代谢组学 核磁共振 尿液 小分子代谢物

中图分类号 R589 文献标志码 A 文章编号 1673-842X(2014)01-0070-04

¹H-NMR Spectroscopy-based Metabonomic Research on Urine of Model Rats of Wilson's DiseaseJIANG Huaizhou¹, LIU Lei², WEI Yangyang^{3,4}, DONG Jiyang⁴, JIANG Zhaoyu¹, JIANG Yuchen⁵

(1. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China; 2. Department of Neurology, Hospital of Bozhou City, Bozhou 236800, Anhui, China; 3. Department of Biology Materials and Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 4. Department of Physics, Xiamen University, Fujian Province Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Xiamen 361005, Fujian, China; 5. Anhui Advanced Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract Objective Applying ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) based metabonomics to study the changes of small molecular metabolites in the urine of the model rats of Wilson's disease. To explore the pathogenesis of Wilson's disease in small molecular aspect. **Methods** 28 male Wistar rats [weight=(180±20)g] were divided into two groups randomly, the model group (n=14) and the control group (n=14), with the models established by copper-loaded method. Urine of the rats was tested with ¹H-NMR technology. The spectra was edited with MestRe-C2.3 and self-programmed software and then principal component analysis (PCA) was applied to differentiate the two groups. **Results** Acetate concentration was found to be significantly higher in the urine of the model group. citrate, PAG, succinate, methylamine, creatine/creatinine, pyruvate, DMG, and alanine were higher, and choline and taurine were lower in the urine of the model group. The small molecular metabolites mentioned above may contribute to the discrimination of the two groups, and provide references for further researches on the pathogenesis of WD.

Key words Wilson's disease metabonomics nuclear magnetic resonance urine 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疾病, 世界范围的发病率约为1/100 000~1/30 000^[1]。由于该病患者的病程和铜沉

收稿日期 2013-06-07

基金项目 安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2012Z228) 安徽中医学院自然科学基金项目(2011ZR008B)

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

积的部位各不相同,其临床表现形式复杂多样,主要有进行性加重的锥体外系症状、肝硬化、肾功能损害及角膜K-F环等,所以该病的误诊率和致残、致死率均较高。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,关于铜对该病患者所造成的机体损伤机理,医学上尚有待进一步解释。

本实验所应用的代谢组学方法是继基因组学、蛋白质组学、转录组学后出现的以定量描述生物体内代谢物多参数变化为目标的新兴“组学”,是系统生物学的组成部分。它是对体液、细胞、器官等样品用质谱、色谱、核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)等技术分离纯化代谢物、检测代谢物组分,再用生物信息学的手段分析处理所获得数据,获取有用信息,得到一个或一组分子标记物,据此可逆向推测出机体在内、外因的刺激下所做出的应答,从而可从系统生物学的代谢组学角度阐明疾病的微观本质。

本实验以基于NMR的代谢组学方法对WD铜负荷模型大鼠^[1]的尿液进行研究,从小分子代谢层面上探讨铜负荷对机体所造成的影响,发现了一些小分子代谢物的异常,可为以后从系统的代谢水平研究铜对机体的损伤提供一些数据参考和新的思路。

1 材料和方法

1.1 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。

1.2 造模方法

将动物随机分为WD铜负荷组($n=14$)和正常对照组($n=14$)。正常对照组始终自由摄食饮水,WD铜负荷组在适应性饲养1周后采用铜负荷法造模,喂饲含硫酸铜1 g/kg的饲料和0.185%的硫酸铜水8周^[1]。

1.3 尿铜的检测^[2]

造模结束前1 d,留取模型组大鼠24 h尿液,摇匀后准确量出尿液体积,测定时取2 mL尿液加0.1 mL H₂SO₄混匀待测,采用原子吸收分光光度计测量、火焰法测定模型组大鼠的24 h尿铜量以判断造模情况。

1.4 NMR尿液标本取材

结束造模后,将造模成功的11只模型大鼠和对照组大鼠置于代谢笼中,集尿瓶放置冰袋上留取其24 h尿液,将收集的尿液置于-80℃冰箱中保存备用。

1.5 肝铜的测量^[2]

剖取肝组织,标本先用0.9% NaCl反复洗净,干净滤纸吸干并称取湿重500 mg用浓硝酸(分析纯)10 mL低温加热进行消化,等组织完全溶解至黄色澄清透明后,采用原子吸收分光光度计测量、火焰法测定铜离子含量。

1.6 NMR数据采集

在厦门大学核磁共振实验室检测大鼠尿液

样品,具体操作和实验参数将参照文献方法进行^[3]:待尿液样本自然解冻后,取500 μL样本,加入250 μL缓冲液(0.2 mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH=7.4, D₂O 99.9% D),并加入适量的DSS作为化学位移定标物,配好后移入5 mm样品管中,在Varian NMR System 500 MHz谱仪上采集样品的¹H-NMR谱,用预饱和和脉冲序列(NOEP)采样并抑制水峰信号。

2 结果

2.1 肝铜及24 h尿铜结果

两组大鼠肝铜、24 h尿铜水平的比较结果见表1。WD铜负荷组的尿铜含量为正常组的4.24倍,肝铜为正常组的19.52倍,尿铜和肝铜含量与对照组相比,其差异具有统计学意义($P<0.001$)。

表1 两组大鼠肝铜、24 h尿铜含量比较

铜含量	对照组平均值	WD模型组
尿铜含量(μg/24 h)	36.9±6.7	156.8±34.0 [*]
肝铜含量(μg/g)	5.5±0.7	108.1±12.6 [*]

注 与对照组比较,* $P<0.001$ 。

2.2 两组动物尿液¹H-NMR谱图

见图1。

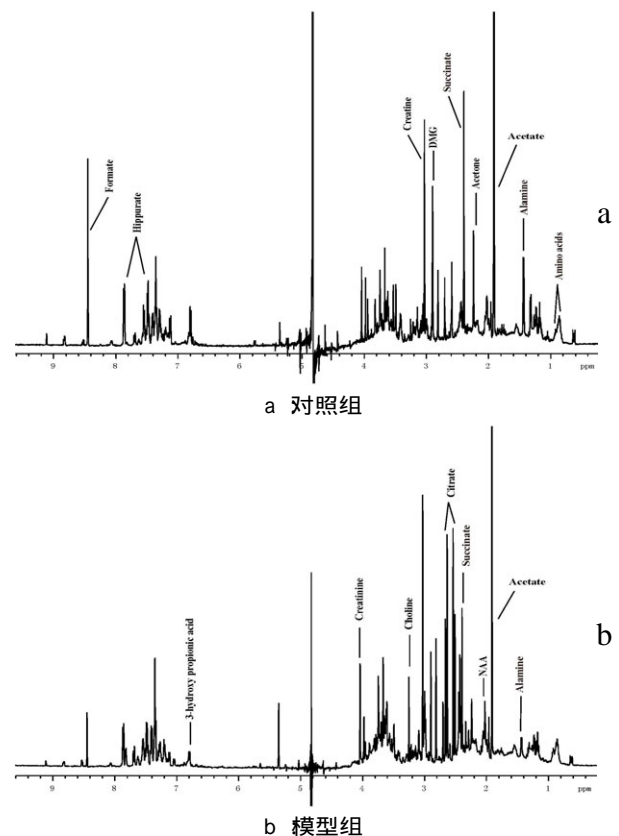
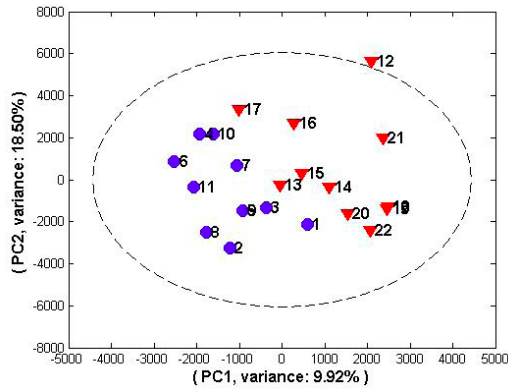


图1 两组大鼠尿液的典型¹H-NMR谱图

2.3 谱图预处理

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0.2~4.6区域按 $\Delta=0.02$ 等间隔分段积分。将积分数据归一化后构成数据矩阵,并利用主成分分析法(Principal Component Analysis, 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尿液的PCA得分图,如图2所示。



为对照组，▼为WD组

图2 对照组大鼠与WD模型大鼠的尿液PCA得分图

在PCA图(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,我们给出正常组和WD组PCA负载图,如图3所示。

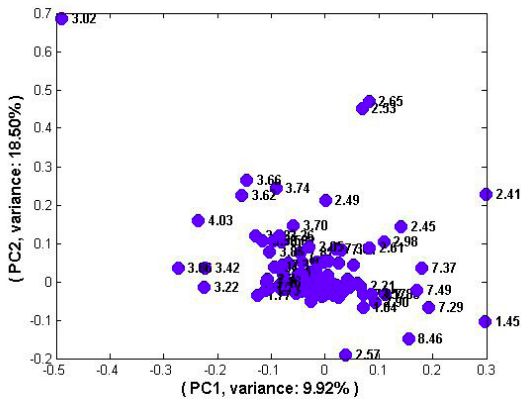


图3 正常组与WD组大鼠尿液PCA负载图

结合负载图和谱图,我们找到了一些对分类贡献较大的代谢物,并将其列在表2中,这些可能是WD模型大鼠的尿液特征代谢物。

表2 WD模型组大鼠尿液特征代谢物信息

可能的特征代谢物	化学位移	变化
acetate	1.91 (s)	
citrate	2.57 (d) 2.71 (d)	
PAG	7.36 (d) 7.42 (d)	
succinate	2.43 (s)	
methylamine	2.49 (s)	
creatine/creatinine	3.04 (s) 3.05 (s)	
pyruvate	2.37 (s)	
DMG	2.93 (s)	
alanine	1.46 (d)	
choline	3.23 (s)	
taurine	3.43 (t) 3.27 (t)	

3 讨论

WD已明确属于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1~2 mg/d,全身铜总量约50~250 mg。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继续在血液中成为与组氨

酸相结合的“直接反应铜”。在正常人体中直接反应铜仅占血中总铜的2%~5%,约95%~98%的铜则由白蛋白转与 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。

本研究发现,相对于正常对照组,模型组大鼠尿液醋酸盐(acetate)含量显著升高,柠檬酸盐(citrate)、苯乙酰甘氨酸(PAG)、琥珀酸盐(succinate)、甲胺(methylamine)、肌氨酸+肌氨酸酐(creatine/creatinine)、丙酮酸盐(pyruvate)、二甲基甘氨酸(DMG)、丙氨酸(alanine)含量有所升高,胆碱(choline)、牛磺酸(taurine)含量有所降低。

磷酸肌酸是肌肉组织能量的贮存形式,肌酸与ATP反应可逆地生成磷酸肌酸,在肌肉收缩时,磷酸肌酸的高能键水解释放能量后转变为肌酸,将能量释放出来。肌酸则在肌酸激酶催化下重新生成磷酸肌酸。本实验中,大鼠尿液中的肌酸和肌氨酸酐有所升高,我们推测其原因有二:一是铜代谢累积会导致肌肉组织中的肌酸激酶活性降低,导致肌酸无法与ATP作用生成磷酸肌酸,转而变为肌氨酸酐,而磷酸肌酸会不断的转化为肌酸,其最终的结果是肌酸和肌氨酸酐的水平升高。另一方面,铜沉积于肾近曲及远曲小管上皮细胞,使之扁平化,基底膜增厚,损伤肾小管的重吸收功能,导致了肾小球率过滤的降低,因此肌酸和肌氨酸酐的水平升高亦提示了WD铜代谢障碍造成的肾毒性^[4-6]。

醋酸是体内一类有用的有机小分子,它的活化形式——乙酰辅酶A是体内代谢的重要物质。主要的转变途径是在脂酰辅酶A合成酶催化下将醋酸、ATP合成乙酰腺苷酸,随后与辅酶A在乙酰辅酶A合成酶的催化下合成乙酰辅酶A,释放出腺苷酸。乙酰辅酶A进入三羧酸循环,首先它与草酰乙酸合成柠檬酸,然后进一步氧化分解成 α -酮戊二酸,之后再分解为琥珀酸,最后变为草酰乙酸,完成三羧酸的代谢循环。我们推测,大鼠的铜代谢发生障碍时,铜作为重金属可以与巯基酶结合使其结构破坏^[7],导致酶促反应速度下降,使整个能量代谢的酶促反应速度降低,乙酰辅酶A合成变慢,醋酸的转化和清除受到抑制。此外,柠檬酸、琥珀酸和丙酮酸亦在能量代谢中转化缓慢,在体内出现累积现象。此时,若肾功能不全,肾小管重吸收能力下降,尿液中则会出现较多的醋酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和丙酮酸盐^[8]。丙酮酸盐是丙氨酸合成的骨架,在体内丙氨酸可以通过转氨酶作用转化为丙氨酸,故丙酮酸盐的聚集必然引起丙氨酸的增多。

牛磺酸及其代谢物是氧自由基清除剂,当前的研究已经证明,牛磺酸具有促神经系统生长发育、增强大鼠学习记忆的作用,对缺血和惊厥等引起的神经元损害也具有对抗作用^[9]。此外,牛磺酸亦有拮抗重金属毒性的作用,其机制可能与其拮抗细胞内钙超载,作为抗氧化剂阻止自由基过氧化过程,保持

不同赋形剂调制双柏散外敷治疗急性胆囊炎临床研究

苑伟,王百林

(广州中医药大学第一附属医院肝胆外科,广东 广州 510405)

摘要 目的 观察双柏散外敷治疗急性胆囊炎患者的临床疗效,确定不同赋形剂调制对其临床疗效的影响,筛选双柏散外敷的最佳赋形剂。方法 本研究对符合方案集分析(简称PPS)的250例急性胆囊炎进行前瞻性临床研究,分为对照组和双柏散治疗组,后者根据不同的赋形剂又分为蜜组、酒组和水组。观察各组症状总分与改善、右上腹痛改善时间、腹部压痛改善时间、腹部反跳痛改善时间等指标改变,及其与不同的赋形剂的关系。结果 (1)临床疗效 生存分析检验结果显示两组在腹痛改善时间和反跳痛缓解时间差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)不同赋形剂与疗效的关系表明 蜜组症状评分明显低于其他组,差异有统计学意义($P<0.05$) 蜜组右上腹痛改善时间和腹部压痛改善时间短于对照组和其他组,具有显著性差异($P<0.05$) 但反跳痛改善时间比较没有显著性差异($P>0.05$)。结论 加味双柏散外敷治疗急性胆囊炎疗效明确,蜜为合适的赋形剂。

关键词 双柏散 急性胆囊炎 中医外治 赋形剂

中图分类号 R575.61 文献标志码 B 文章编号 1673-842X(2014)01-0073-05

Clinical Research of *Shuangbai* Powder of Different Excipients Modulation
by External Application in Treatment of Acute Cholecystitis

YUAN Wei, WANG Bailin

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangzhou
University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China)

Abstract *Objective* To observe the clinical efficacy of *Shuangbai* Powder by external application for the patients with acute cholecystitis, and to determine the clinical efficacy of the different modulations of the excipients, screening the best excipient for *Shuangbai* Powder external application. *Methods* This research was a prospective clinical study on the 250 patients with acute cholecystitis which were analysed by per-

神经细胞膜的完整等有关^[10]。本研究发现模型组大鼠体内牛磺酸含量有所降低,由此可推测,铜对大鼠神经系统所造成的损伤可能与牛磺酸的降低有关。

在本实验中,我们利用基于NMR的方法对正常鼠与WD铜负荷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。除肌酐等代谢物与传统的生化检测结论吻合以外,更进一步发现了有关于铜负荷的新的可能性特征代谢物。这些新的特征代谢物的发现可以帮助更好的探讨和认识铜过量对机体的损伤,为以后对WD的研究及其治疗提供一个思路。同时,本研究也表明,基于NMR的代谢组学技术可以较好地用于WD铜负荷模型大鼠与正常对照组大鼠的区分,从而获得具有特征性的代谢物,是寻找WD铜负荷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] Aftab Ala, Ann P Walker, Keyoumars Ashkan. Wilson's Disease [J]. Lancet 2007 (2) 369-408.

- [2] 徐磊,蔡永亮,徐志树,等.凯西莱联合青霉胺治疗肝豆状核变性模型鼠的研究[J].临床神经病学杂志 2007 20(6): 450-452.
- [3] 危阳洋,王彩虹,李伟,等.甲亢患者血清和尿液的核磁共振代谢组学研究[J].高等学校化学学报 2010 31(2): 279-284.
- [4] J. Feng, X. Li, F. Pei, et al. 1H NMR analysis for metabolites in serum and urine from rats administrated chronically with La (NO₃)₃ [J]. Anal Biochem 2002 301 1-7.
- [5] Zhen Chen, Huan Meng, Gengmei Xing. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo [J]. Toxicology Letters, 2006, 163 (2) 109-120.
- [6] Abhijit Sarkar, Joydeep Das, Prasenjit Manna, et al. Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways [J]. Toxicology 2011 290 (2) 208-217.
- [7] 刘鹏,陈辉,赵文阁.重金属对无尾两栖类蝌蚪的毒性效应研究进展[J].中国农学通报 2011 27(17) 273-276.
- [8] 赵剑宇.基于核磁共振的代谢组学方法在中药关木通肾毒性研究中的应用[D].北京 军事医学科学院科技部 2008 64.
- [9] Shuaib A. The role of taurine in cerebral ischemia studies in transient forebrain ischemia and embolic focal ischemia in rodents [J]. Advances in experimental medicine and biology 2003 526: 421-431.
- [10] 黄世文,郭松超,陆彩玲.牛磺酸对染锰大鼠海马神经毒性的影响[J].中国职业医学 2008 35(5) 374-377.

收稿日期 2013-06-06

基金项目：“十一五”国家科技支撑计划项目(2008BAI53B034)

作者简介 苑伟(1987-)男,山东济宁人 2011级硕士研究生,研究方向 肝胆外科疾病。

通讯作者 王百林(1966-)男,山东济宁人,教授、主任医师,硕士研究生导师,研究方向 肝胆外科疾病。E-mail wangbailin888@sina.com。