

基于¹H核磁共振谱分析的自发性高血压大鼠尿液代谢特征

马晓丽¹, 骆新², 卢伟², 李琳琳², 王烨², 毛新民³

(新疆医科大学 1. 分析测试中心; 2. 基础学院药理教研室; 3. 中医学院; 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 采用¹H核磁共振谱分析结合偏最小二乘分析(PLS-DA)方法研究自发性高血压大鼠和Wistar大鼠尿液的成分谱差异,寻找可能的生物标记物。方法 选取自发性高血压大鼠和Wistar大鼠,连续4周收集尿液,以¹H-NMR分析两组大鼠的尿液成分,使用PLS-DA方法进行模式识别,通过OPLS-DA的相关系数寻找差异标记物。结果 PLS-DA方法处理高血压大鼠和Wistar大鼠的¹H-NMR谱数据显示,两组¹H-NMR谱数据可以在得分图中明显区分,且代谢趋势在连续4周测定均非常稳定,说明自发性高血压大鼠有着特定的代谢模式,通过OPLS相关系数分析出体内部分氨基酸代谢产物和葡萄糖等能量代谢物质明显异于正常大鼠。结论 ¹H-NMR结合PLS-DA模式识别的代谢组学方法具有研究复杂条件下机体病理生理变化的优势,为了解高血压大鼠的代谢特征提供了科学依据。

【关键词】 高血压大鼠;代谢组学;¹H核磁共振谱分析;尿液

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0020-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.005

Investigation into the urinary metabolomic profiling of spontaneously hypertensive rat (SHR) based on ¹H-NMR analysis

MA Xiao-li¹, LUO Xin², LU Wei², LI Lin-lin², WANG Ye², MAO Xin-min³

(1. Analytical Testing Center of Xinjiang Medical University, 2. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, 3. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830011, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the application of metabolomics in research of the metabolic profiling of spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar rats using NMR combined with PLS-DA. **Methods** SHRs were fed with normal diet for 1 week and then the urines of normal rats and SHR hypertensive model rats were collected at 1, 2, 3, and 4 weeks. The metabolic profiles were analyzed using ¹H-NMR. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to determine the differential biomarkers. **Results** The systolic blood pressure (SBP) of SHRs were significantly higher than that of normal rats. Using PLS-DA and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), it was also possible to distinguish them in the principal components score plot. In the SHRs, the levels of some amino acids and some small molecular substances were higher than those in the control rats. **Conclusions** NMR combined with PLS-DA is a promising approach to provide the information on metabolic changes related to the pathophysiological processes in spontaneously hypertensive rats.

【Key words】 Spontaneously hypertensive rats; Metabolomics; ¹H-NMR; Urine

高血压是由环境因素和遗传因素共同作用所致的一种多基因和多因素的复杂性疾病,也是2型糖

[基金项目]新疆维吾尔自治区科技支撑项目(No:201333119);国家自然科学基金项目(No:81260144)。

[作者简介]马晓丽,女,副教授,博士,研究方向:新药质量标准研究。

[通讯作者]毛新民,男,教授,博士生导师,研究方向:抗糖尿病新药研究,邮箱:mxm3277@sina.com

尿病,心血管疾病、中风的危险因素,但其病因目前尚不清楚。近年来,国内外许多学者采用基因组学、蛋白组学研究其发病机制,但结果并不十分理想。代谢组学可从整体水平研究机体受内源和外源刺激后小分子代谢物的变化规律,揭示疾病的发生发展过程。因此,在高血压病的发病机制阐述上具有独特的优势。

自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)是目前国际上公认的最接近于人类原发性高血压的动物模型,本研究欲通过核磁共振氢谱技术对高血压大鼠尿液进行代谢组学分析,通过 PLS-DA 方法寻找高血压大鼠模型不同阶段尿液的代谢谱变化,探索代谢组学在高血压研究中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

11 周龄的 SPF 级雄性 SHR 大鼠 6 只,同周龄雄性 Wistar 大鼠 8 只,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-0001】,饲养于新疆医科大学实验动物中心,昼夜明暗交替时间 12h/12h,温度(21±2)℃,湿度 45%~55%。

将雄性 SHR 大鼠和 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后,连续两天测量大鼠血压,同时收集尿液。8 只 Wistar 大鼠为空白组。SHR 大鼠作为模型组,两组喂食普通饲料,自由进水。

1.2 试剂与仪器

低温超速离心机:美国 Beckman 公司;Inova600 型核磁共振波谱仪:美国 Varian 公司;−80℃ 超低温冰箱:中国海尔公司;重水(Cambridge Isotope Laboratories, Inc 产品);NaCl、K₂HPO₄、NaH₂PO₄(天津市光复精细化工研究所),TSP,核磁管,蒸馏水。

1.3 收缩压(SBP)测定

实验采用采用 BP-98A 无创血压计每 5 d 测量血压一次。操作时,先将大鼠装进保温套中加热 5 min 左右,连续测量 5~6 次,取收缩压(SBP)平均值为该大鼠的血压值。比较两组大鼠血压变化。

1.4 尿液标本收集处理

分别于造模后 1、2、3、4 周末,代谢笼中收集 12 h 大鼠尿液,−80℃ 冰箱保存。尿液代谢谱测定方法:每个尿液样本各取 400 μL,每个样本加入 200 μL 重水配制的磷酸缓冲液中,室温放置 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 550 μL 放入 5 mm 核磁管中。用 Inova600 兆核磁共振波谱仪调用 Noesy-

Presat-1D (RD-90°-t1-90°-tm-90°-acquisition) 脉冲序列进行氢谱测定。对¹H 核共振频率为 500.13 MHz,累积扫描 64 次,采样数据点 32 768,谱宽 20 mg/L,采样延迟 2 s,每次扫描时间均为 1.64 s,测试温度 25℃,采用预饱和方法压制水峰。

1.5 图谱处理和数据分析

尿液¹H 核磁共振图谱(¹H-NMR 谱)进行基线及相位调整后选择 H 为 10.0~0.5 ppm 的区域进行自动积分,积分区间设为 0.003 ppm。为了消除饮水量对代谢物浓度的影响,积分值进行归一化处理(每一段积分值除以所有积分值之和)。用 SIMCA-P⁺ 软件进行最小方差判别分析法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)进行统计分析和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)。

PLS-DA 主要用于观察各组样本是否有差异性,而两组中具有差异性的积分段的判断则用 OPLS-DA。通过 OPLS-DA 获得的每一个积分段所代表的代谢物相关系数(*r*)来确定不同组尿液中的差异性代谢成分,检验标准为 $P = 0.05$ 。在本研究中,根据皮尔森相关系数显著性差异检测(Pearson's product moment correlation coefficient)确定 $|r|$ 大于 0.707 (样品数 $n = 6$) 所代表的代谢物是统计学上有显著性差异($P < 0.05$)的代谢物临界值。 $|r|$ 值越大表示差异性越大,反之越小。

2 结果

2.1 SHR 模型确证

由表 1 可知,SHR 和 Wistar 大鼠在 SBP 上有显著的差异,SHR 的平均 SBP 均超过 190 mmHg,远高于 Wistar 大鼠的血压,差异有统计学意义。

2.2 SHR 和 Wistar 大鼠尿液的代谢特征比较

2.2.1 模型组与对照组代谢模式的比较

NMR 分析得到的谱图数据经过提取和前处理得到的矩阵在 SIMCA-P 软件中进行多维统计分析,采用有监督的 PLS-DA 方法,对动物样本进行分组处理。从结果看出,模型组与对照组的代谢轮廓谱在 1 周、2 周、3 周、4 周后有清晰的区分,说明高血压大鼠在代谢特征上与正常大鼠存在着差异(图 1 A、B)。

为了更加直观地将正常大鼠在喂养过程以及模型大鼠在成模后代谢模式的变化呈现,本实验将对对照组和模型组大鼠尿样的代谢组数据进行多维统计的分析。结果表明,对照组动物在喂养的过程中,随

表 1 SHR 和 Wistar 大鼠的血压比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Systolic blood pressure of the Wistar and SHR rats

组别 Groups	适应性喂食 Adaptive feeding	第 5 天 Day 5	第 10 天 Day 10	第 15 天 Day 15	第 20 天 Day 20	第 25 天 Day 25	第 28 天 Day 28
空白组 Blank $n=8$	127 ± 2.7	128 ± 5.7	127 ± 5.3	126 ± 5.7	126 ± 4.2	127 ± 4.1	125 ± 4.4
模型组 Model $n=6$	193 ± 6.7*	190 ± 2.7*	191 ± 4.1*	190 ± 4.4*	191 ± 4.0*	190 ± 4.5*	190 ± 3.9*

注:与模型组相比*代表 $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, * represents $P < 0.01$.

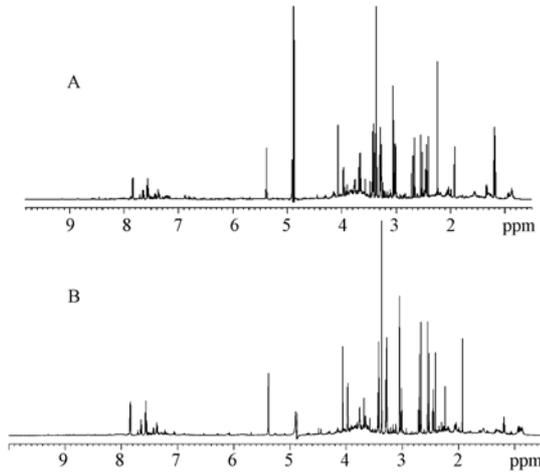


图 1 为 SHR 和 Wistar 大鼠尿液样品典型的 NMR 图谱(A 正常大鼠,B 高血压大鼠)

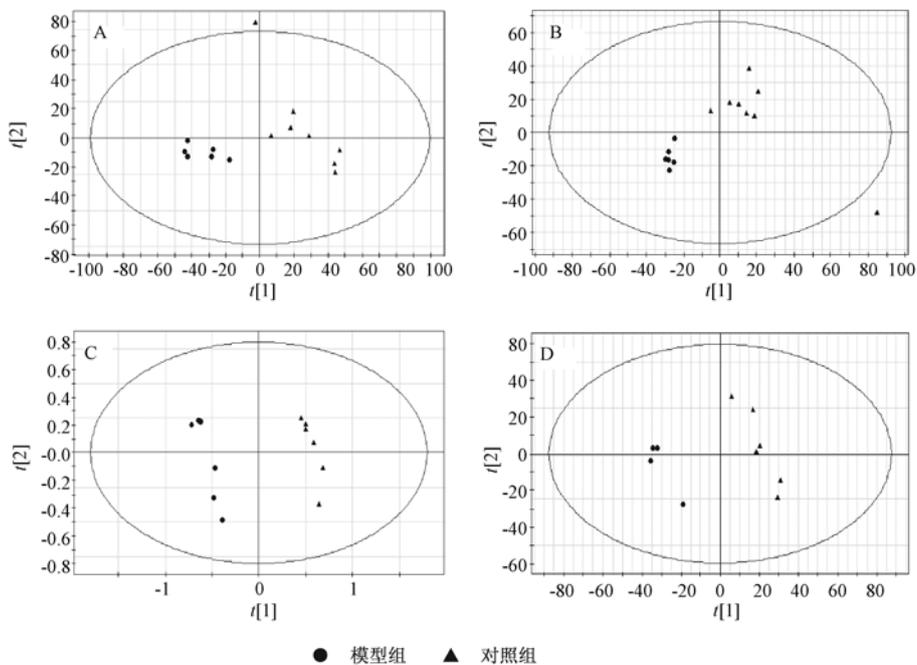
Fig. 1 Typical NMR chromatograms of the urine samples from Wistar (A) and SHR (B) rats

着时间的推移,高血压模型大鼠代谢模式则呈现规律性变化,随时间变化不明显,说明 SHR 高血压大鼠有着特定的代谢模式(图 2)。

2.2.2 样本的 OPLS-DA 分析

为了更好的反应高血压病理状态下产生的差异,试验中采用了正交偏最小方差—判别分析(OPLS-DA 分析)。通过这种监督的方法建立的模型,可以找到对模型影响较大的代谢物变量,而这些代谢物有利于对高血压大鼠模型发生机制做深入的理解。

本实验选择了区分度最好的第 3 周的样品进行 OPLS-DA 的代谢模式比较。对照组大鼠与模型组大鼠尿液代谢物有着很好的区分,并且分析了差异变量(见表 2)。



注: A: 造模1周后; B: 造模2周; C: 造模3周; D: 造模4周。

注: A: 造模 1 周后; B: 造模 2 周; C: 造模 3 周; D: 造模 4 周。

图 2 模型组与对照组在不同阶段的代谢模式

Note. A. One week after modeling. B. Two weeks after modeling. C. Three weeks after modeling. D. Four weeks after modeling.

Fig. 2 Comparison of the metabolic profiles of the model and control groups

表 2 尿液代谢谱中主要代谢物的变化

Tab. 2 Changes of main variables in the urine metabolic profiles of the rats

代谢物名称 Metabolites	位移 Shift	模型组与对照组变化方向 Change trends	P 值 P-value
异亮氨酸 Isoleucine	0.93(t), 1.00(d)	↑	0.88
亮氨酸 Leucine	0.95(t)0.97(d)	↑	0.89
缬氨酸 Valine	0.98(d)1.03(d)	↑	0.85
苯丙氨酸 Phenylalanine	3.96(dd)	↑	0.81
丙氨酸 Alanine	1.47(d)	↑	0.73
肌酸酐 Creatinine	3.06(s)	↑	0.77
鲨肌醇 Scyllitol	3.35(s)	↑	0.74
甜菜碱 Betaine	3.27	↑	0.77
甘氨酸 Glycine	3.55(s)	↑	0.75
α-葡萄糖 α-glucose	3.53(dd)	↑	0.80
酪氨酸 Tyrosine	3.94	↑	0.74

3 讨论

从实验结果来看,在适应性喂食一周后高血压大鼠模型组与对照组大鼠的尿液代谢谱即有明显差异;在随后的 4 周中,分别收集两组大鼠的尿液进行核磁共振代谢谱的比较,发现模型组与对照组之间的代谢轮廓趋势非常稳定,能明显分离,说明高血压大鼠尿液的生理模式有其固定的规律并且与正常大鼠不同,表明尿液的代谢谱中可能包含有高血压的病理变化信息。为了确定自发性高血压大鼠相关的代谢物,选取第三周尿液样本进行 OPLS-DA 的代谢模式比较,通过相关系数找出了多个差异变量。

由于尿液是一种含有许多内源性化合物的复杂体液,因此利用高通量、高灵敏的分析手段结合模式识别可以区分疾病模型和正常个体,找出区分两者的内源性化合物,建立疾病经典指标与代谢组学中生物标志物的关系,从而为研究发病机理提供依据。本实验研究表明:在 SHR 模型大鼠尿液中发现多种氨基酸的浓度显著高于正常对照大鼠,包括亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸和一些有机酸(如丙酸)的表达水平在模型组中都有上升。可能是由于蛋白质代谢出现紊乱,肌肉及肝中蛋白质合成减少而分解增多,血浆及尿液中氨基酸增多所致。

另外,本实验还检测到一些小分子代谢物,如甜菜碱、肌酸酐、鲨肌醇等含量在模型组显著升高甜菜碱主要是由食物经过肠道内的菌群代谢而产生,代

谢的母体主要是食物中的多酚和食物蛋白分解出来的一些芳香族的氨基酸,如苯丙氨酸、酪氨酸等,表明高血压大鼠的肠道内的菌群代谢可能发生紊乱。对这些内源性化合物代谢通路的进一步分析,对于深入研究糖尿病的病因及发病机制有着极其重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with the metabolomics [J]. Anal Chem, 2003, 75(17):384A-391A.
- [2] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK, et al. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis [J]. Biomarkers, 2004, 9:1-31.
- [3] 陆益红,王广基,黄青,等. 自发性高血压大鼠血浆代谢组学研究及人参皂苷作用机制初探 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(6):443-446.
- [4] 袁琳,白永生,周明眉,等. 2 型糖尿病大鼠的尿液代谢组学改变 [J]. 中国实验动物学报. 2011, 19(2):111-114.
- [5] 蒋海强,马斌,聂磊,等. 高血压病肝阳上亢证患者尿液样品的核磁共振谱代谢组学研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(5):662-665.
- [6] 帕丽丹·吾术尔. 老年痴呆异常黑胆质证结合模型的建立及异常黑胆质成熟剂的干预研究 [D]. 新疆医科大学博士论文, 2013 年.
- [7] 邱云平. 基于色谱质谱联用技术的大肠癌代谢组学研究 [D]. 上海交通大学博士论文, 2013 年.

[收稿日期] 2013-12-05