

• 基础实验研究论著 •

溶血对基于核磁共振技术代谢组学研究的影响*

刘巧^{1,2}, 刘娟², 孙博², 张琪², 毛静³, 董方霆², 颜贤忠^{2△}

(1. 中南大学药学院, 湖南长沙 410013; 2. 国家生物医学分析中心, 北京 100850;

3. 总后勤部北京老干部服务管理局, 北京 100071)

摘要:目的 研究因溶血而造成的血浆标本中小分子代谢物组成及浓度的变化, 探讨血浆标本溶血对代谢组学研究造成的影响。方法 未发生溶血及发生溶血的健康男性血浆样本各 10 份, 经核磁共振波谱仪检测后, 应用 SIMCA- P12.0 软件对积分数据进行正交偏最小二乘判别分析及相关性分析。结果 溶血组标本中涉及糖代谢、脂代谢及氨基酸代谢的多种小分子代谢物浓度发生改变。结论 溶血可影响代谢组学分析结果, 在实际操作中应该避免。

关键词: 磁共振波谱; 代谢; 分子生物学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0916-03

The effect on NMR-based metabonomics caused by hemolysis*

Liu Qiao^{1,2}, Liu Juan², Sun Bo², Zhang Qi², Mao Jing³, Dong Fangting², Yan Xianzhong^{2△}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China;

2. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China; 3. Clinic Medicine

Subject of Beijing Retire Cadre Administration of General Logistics, Beijing 100071, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of hemolysis on metabonomic results caused by the variation of plasma metabolite composition and concentration. **Methods** Nuclear Magnetic Resonance (NMR) based metabonomics was applied to analyze the plasma metabolic difference between plasma samples with hemolysis ($n=10$) and without hemolysis ($n=10$) obtained from healthy male subjects. OPLS-DA and Pearson's correlative analysis was applied to the spectra data. **Results** The levels of metabolites involved in glucose, lipid and amino acid metabolism were changed in plasma samples with hemolysis. **Conclusion** Hemolysis could have effect on metabonomic results which should be avoided in studies.

Key words: magnetic resonance spectroscopy; metabolism; molecular biology

代谢组学是通过对一个生物系统在给定时间和条件下所有小分子代谢物质进行定性定量分析, 进而描述生物内源性代谢物质的整体及其对内因和外因变化应答规律的科学, 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后, 系统生物学的重要组成部分^[1]。代谢组学已经广泛地应用到了分子病理学、药理学、毒理学、临床医学和环境科学等与人类的健康密切相关的领域^[2]。血液作为方便易得的生物体液, 承载着丰富的小分子代谢物信息, 能较为全面地反映机体的实际状态, 是最为常用的代谢组学研究对象。溶血是目前血液标本收集过程中难以避免的问题, 根据发生原因的不同可以分为两大类, 一是内在因素引起的溶血, 由自身溶血性疾病、物理因素、生物因素和药物毒性反应等因素引起; 二是外在因素引起的溶血, 即血液标本采集、运送、分离或保存过程中, 由于外界各种原因导致的血小板、血细胞破坏, 胞内组分释放进入血清或血浆中, 导致血液标本出现特有的红色增加。已有研究表明外在因素引起的溶血将导致生化检测结果不准确, 难以如实地反映机体的实际状况^[3-5]。溶血发生后, 样本的测定结果能否参与代谢组学研究是实验工作者关注的问题。目前尚无研究探索血液样本溶血引起的代谢物的变化。本研究采用基于核磁共振(NMR)技术的代谢组学方法检测溶血及未发生溶血的正常人血浆内源性小分子代谢物, 结合模式识别技术探讨溶血样本对代谢组学分

析所造成的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2010 年 1 月武警总医院门诊体检中心采集的血浆(柠檬酸钠抗凝), 筛选条件为血浆源自体检结果正常且近期无药物服用史的男性成年人。血浆样本分组情况如下: 溶血组 10 例, 平均年龄(43.4 ± 8.0)岁; 未溶血组 10 例, 平均年龄(43.8 ± 7.9)岁。两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 Varian INOVA 600MHz 超导脉冲傅立叶变换核磁共振谱仪购自美国瓦里安公司; 艾本德 5810R 离心机购自德国艾本德公司; 重水(D_2O) 购自美国 Norell 公司; 三甲基甲硅烷基丙酸购自加拿大默克公司。

1.3 方法 取常温解冻后的血浆 $350 \mu L$, $13\ 000\ r/min$ 离心 10 min。取上清液 $300 \mu L$, 加入 $100 \mu L$ TSP 重水溶液($1\ mg/mL$)和 $200 \mu L\ D_2O$, 涡旋混匀, 加至 5 mm 核磁管中, 用于核磁共振检测。用 VARIAN 600 MHz 超导核磁共振波谱仪采集一维氢谱。采用弛豫编辑脉冲序列抑制由蛋白和脂蛋白等物质产生的宽峰, 获得血浆中小分子代谢物的信息。实验主要参数为: 谱宽 $8\ 000\ Hz$ 、弛豫延迟时间 2 s、采样点数 64 k、累加次数 64 次, 采用预饱和方式抑制水峰。自由感应衰减(FID)信号经过傅立叶变换转为一维 NMR 谱图。谱图采集后, 经相位

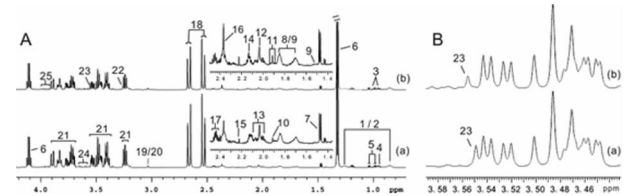
* 基金项目: 国家自然科学基金(30973676、81001419); 国家自然科学基金重大研究计划(90409019)。 作者简介: 刘巧, 女, 在读研究生, 主要从事药物分析学研究。 △ 通讯作者, E-mail: yanxz@bmi.ac.cn。

调整并进行基线校正,乳酸双峰左侧峰定标,化学位移定为 δ 1.33 ppm,将 4.4~0.4 ppm 范围内的谱图按照每段 0.002 ppm 进行分段积分。以积分按每张谱的总积分强度为 10 000 进行归一化,消除由样品间浓度差异所带来的影响,所得数据输出并转换到 Excel 文件后保存。

1.4 统计学处理 应用 Savorani 等^[6]报道的方法对积分数据进行对齐处理,消除由血浆 pH 及离子强度差异所造成的谱峰漂移。对齐后的数据导入多元统计分析软件 SIMCA-P 12.0 中进行模式识别及皮尔森相关性分析。单位方差标度化之后的数据采用正交偏最小二乘判别法进行模式识别分析,用七倍交叉验证法验证模型的耐用性和有效性。其中 R2X 和 R2Y 的值反映模型拟合情况,Q2 值表示模型的预测能力。用 MATLAB R2008a 软件做出相关系数因子载荷图。此图能客观且便捷的呈现组间差异代谢物。

2 结 果

2.1 ¹H NMR 谱 图 1A 为两组血浆样本代表性的 CPMG ¹H NMR 谱图。根据文献[7-8]报道结合实验室自有标准品谱库及 Chenomx NMR suite 软件,对 NMR 谱中质子信号进行代谢物归属,指认结果见表 1。由图 1A 可见,相对于未溶血样本而言,溶血样本中乙酸盐,丙酮,丙酮酸含量较高,而葡萄糖含量较低。图 1B 为 δ 1.38~2.5 ppm 段局部放大图,由此图可知,甘氨酸-CH2 峰的化学位移在溶血组中向高场移动。



A:未溶血组(a)及溶血组(b)血浆代表性¹H 核磁共振谱图(δ 1.38~2.5 ppm 处谱峰强度较原图放大了 7 倍);B:未溶血组(a)及溶血组(b)血浆¹H 核磁共振谱局部放大图。

图 1 核磁共振谱图

表 1 溶血组与未溶血组血浆中主要差异代谢物及谱峰归属*

序号	代谢物	化学位移(ppm) 及峰形	相关系数(r)
1	脂类(LDL)	0.85(t),1.25(m)	—
2	脂类(VLDL)	0.87(t),1.29(m),1.57(m)	—
3	异亮氨酸	0.94(t),1.01(d),1.27(m),1.47(m),1.96(m)	-0.778
4	亮氨酸	0.92(d),0.95(d),1.70(m)	0.745
5	缬氨酸	0.98(d),1.05(d),2.27(m),3.62(d)	0.716
6	乳酸	1.33(d),4.11(q)	0.631
7	丙氨酸	1.47(d),3.78(q)	—
8	精氨酸	1.70(m),1.86(m),3.23(t),3.76(t)	—
9	赖氨酸	1.47(m),1.70(m),1.86(m),3.76(t)	0.923
10	乙酸盐	1.91(s)	0.801
11	脯氨酸	1.99(m)	0.925
12	N-乙酰糖蛋白	2.04(s)	0.704
13	谷氨酸	2.08(m),2.12(m),2.34(m),3.75(m)	0.841
14	蛋氨酸	1.98(m),2.13(s),2.17(m),2.66(dd),3.78(m)	0.869

续表 1 溶血组与未溶血组血浆中主要差异代谢物及谱峰归属*

序号	代谢物	化学位移(ppm) 及峰形	相关系数(r)
15	丙酮	2.22(s)	0.719
16	丙酮酸	2.41(s)	0.747
17	谷氨酰胺	2.13(m),2.45(m),3.77(m)	-0.66
18	柠檬酸	2.54(d),2.65(d)	—
19	肌酸	3.04(s),3.93(s)	0.853
20	肌酐	3.05(s),4.05(s)	0.901
21	葡萄糖	3.24(dd),3.48(t),3.90(dd)	-0.808
22	氧化三甲胺	3.26(S)	0.884
23	甘氨酸	3.56(S)	0.741
24	甘油	3.56(dd),3.65(dd),3.87(m)	0.952
25	丝氨酸	3.83(dd),3.96(m)	0.874

*:r 值为正表示溶血组中含量上升,为负表示溶血组中含量下降,“—”表示变化无统计学意义;s 为单峰,d 为双重峰,t 为三重峰,q 为四重峰,m 为多重峰,dd 为双二重峰。

2.2 多元统计分析 为了更客观准确地进行分析,强化组间差异,本研究采用正交偏最小二乘判别法的方法滤除与分组无关的成分^[9]。偏最小二乘判别分析结果显示,溶血组和未溶血组样本有明显的组内聚集及组间分离趋势。使用交叉验证法对模型的预测能力进行评估,参数为 R²X=0.444,R²Y=0.985,Q²=0.839,表明模型的耐用性及预测能力均较高。将检验标准设为 P=0.05,通过皮尔森相关系数显著性差异检测,确定 0.602 作为代谢物含量变化是否具有统计学意义的阈值。相关系数的绝对值|r|>0.602 表示的是差异具有统计学意义的代谢物(P<0.05)。相关系数为正值的代谢物是在发生溶血的样本中含量升高的代谢物,负值表示在发生溶血的样本中含量降低的代谢物,具体内容见表 1。由表 1 可知,相对于未溶血样本,溶血样本中亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、脯氨酸、N-乙酰糖蛋白、肌酸、肌酐、甘油、丝氨酸等含量较高。而异亮氨酸、谷氨酰胺含量较低。

3 讨 论

已有研究报道表明年龄和性别因素可对代谢组学研究造成影响^[10-11],本研究中两组样本均来自健康男性,组间年龄差异无统计学意义,排除了这些因素的干扰。过去的研究表明,血细胞中富含氨基酸,在体内氨基酸池的代谢过程中发挥着重要作用^[12-13]。此次研究发现,多种氨基酸包括亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、谷氨酸,甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸等在溶血组中的含量较未溶血组高。这可能是由于溶血导致血细胞破裂,大量细胞内物质进血液。而分析中发现蛋氨酸,异亮氨酸含量相对较低。已知这两种氨基酸在血细胞与血浆中含量较低^[13],溶血后细胞内液对血浆的稀释作用,使测得的结果下降。成熟红细胞内无线粒体多进行无氧呼吸。红细胞破裂后多种糖酵解代谢物及相关酶类进入血浆,因而葡萄糖含量降低,糖酵解相关的代谢物丙酮酸,乳酸,乙酸盐含量上升。随着细胞膜的破裂,细胞膜成分 N-乙酰糖蛋白及脂溶性成分进入血浆,脂代谢相关物质甘油、丙酮等的含量升高。此次研究中还发现溶血组中肌酸含量升高,与早期报道的红细胞中富含肌酸并可作为红细

胞溶血性疾病诊断指标相互印证^[14-15]。值得一提的是,作为血红素组成部分的甘氨酸,在溶血组中含量升高,其在 3.56 ppm 处的亚甲基峰的化学位移值在溶血组中明显向高场漂移。相关研究表明,甘氨酸的化学位移与溶液 pH 值密切相关^[16],提示溶血发生后,血浆 pH 值也发生了相应改变。

代谢组学从全局角度研究机体全部小分子代谢物的对内因刺激所产生的应答,溶血导致血标本中多种小分子代谢物的浓度发生改变,而这种改变,将会扰乱或掩盖其他因素带来的变化。例如,本研究中发现葡萄糖含量降低,乳酸等糖酵解产物物质含量上升,就与多种癌症如肝癌、肺癌等疾病的代谢模式相似,容易导致模式识别分析产生错误的结果^[17-18]。

本研究采用基于 NMR 技术的代谢组学方法,首次探讨了溶血发生后,血浆中小分子代谢物的变化。研究结果表明,溶血导致血浆中多种小分子物质浓度发生改变,涉及糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等多种代谢路径,会影响代谢组学分析的结果。因此,在代谢组学研究中,应尽量避免使用发生溶血的样本。

参考文献

[1] Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation; seeing the wood with the trees[J]. J Exp Bot, 2005, 56(410): 245-254.

[2] 颜贤忠, 赵剑宇, 彭双清, 等. 代谢组学在后基因组时代的作用[J]. 波谱学杂志, 2004, 21(2): 263-271.

[3] Yücel D, Dalva K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests[J]. Clin Chem, 1992, 38(4): 575-577.

[4] Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(3): 311-316.

[5] 刘志峰, 李大磊, 李春梅, 等. 血清标本溶血对大鼠血液生化指标的影响[J]. 毒理学杂志, 2007, 20(6): 392-393.

[6] Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra[J]. J Magn Reson, 2010, 202(2): 190-202.

[7] Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, et al. 750 MHz ¹H and ¹H-

¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. Anal Chem, 1995, 67(5): 793-811.

[8] Sun L, Hu W, Liu Q, et al. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients[J]. J Proteome Res, 2012, 11(5): 2937-2946.

[9] 杨茂龙, 孙权森, 夏德深. 二维共轭正交偏最小二乘分析及图像识别应用[J]. 计算机工程与应用, 2008, 44(29): 36-39.

[10] Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, et al. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics[J]. Anal Biochem, 2006, 352(2): 274-281.

[11] Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, et al. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics[J]. NMR Biomed, 2008, 21(3): 195-207.

[12] 马亚楠, 刘树业. 生理体液法分析肝硬化及肝癌患者的血清氨基酸变化[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(11): 2088-2090.

[13] 丁晓红, 穆文广. 肝硬化患者血细胞内氨基酸检测的临床研究[J]. 临床肝胆病杂志, 1998, 14(2): 97-99.

[14] Griffiths WJ, Fitzpatrick M. The effect of age on the creatine in red cells[J]. Br J Haematol, 1967, 13(2): 175-180.

[15] Fehr J, Knob M. Comparison of red cell creatine level and reticulocyte count in appraising the severity of hemolytic processes[J]. Blood, 1979, 53(5): 966-976.

[16] Xiao C, Hao F, Qin X, et al. An optimized buffer system for NMR-based urinary metabonomics with effective pH control, chemical shift consistency and dilution minimization[J]. Analyst, 2009, 134(5): 916-925.

[17] Gao H, Lu Q, Liu X, et al. Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis[J]. Cancer Sci, 2009, 100(4): 782-785.

[18] Rocha CM, Carrola J, Barros AS, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids; NMR-based metabonomics of blood plasma[J]. J Proteome Res, 2011, 10(9): 4314-4324.

(收稿日期: 2012-11-09)

(上接第 915 页)

[12] Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S, et al. Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin[J]. Cancer Res, 2008, 68(4): 1188-1197.

[13] Lotz GP, Lin H, Harst A, et al. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17228-17235.

[14] Haruta M, Sussman MR. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2012, 158(3): 1158-1171.

[15] Passinen S, Valkila J, Manninen T, et al. The C-terminal half of Hsp90 is responsible for its cytoplasmic localization[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(20): 5337-5342.

[16] Lee CH, Park JH, Choi JH, et al. Heat shock protein 90 and its cochaperone, p23, are markedly increased in the aged gerbil hippocampus[J]. Exp Gerontol, 2011, 46(9): 768-772.

[17] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein

homeostasis; emerging mechanistic insights[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(7): 515-528.

[18] Chua CS, Low H, Lehming N, et al. Molecular analysis of Plasmodium falciparum co-chaperone Aha1 supports its interaction with and regulation of Hsp90 in the malaria parasite[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 233-245.

[19] Xu W, Mollapour M, Prodromou C, et al. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine[J]. Mol Cell, 2012, 47(3): 434-443.

[20] Imai J, Maruya M, Yashiroda H, et al. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome[J]. EMBO J, 2003, 22(14): 3557-3567.

[21] Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, et al. Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver[J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(11/12): 777-783.

[22] Sisoula C, Trachana V, Patterson C, et al. CHIP-dependent p53 regulation occurs specifically during cellular senescence[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(1): 157-165.

(收稿日期: 2012-11-29)