

• 论 著 •

基于质谱技术对森林脑炎患者血清代谢组学的研究^{*}

王晓艳,李 翔,肖 翔,陆德生,张仕华,杜彦丹[△]

内蒙古林业总医院/内蒙古民族大学第二临床医学院,内蒙古呼伦贝尔 021000

摘 要:**目的** 利用代谢组学技术对森林脑炎致病机制进行可视化分析,寻找与疾病发生发展相关的生物标志物。**方法** 利用高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)技术,对 59 例森林脑炎患者与 39 例健康人群进行对比分析,结合多元统计分析方法进行标志物筛选。**结果** 共筛选得到 144 种差异代谢物,通过代谢通路富集分析发现,差异代谢物覆盖了多种氨基酸通路,以及多个脂类相关的代谢通路包括脂蛋白生物合成、花生四烯酸生物合成、白三烯生物合成。**结论** 质谱技术联合多元统计方法可用于疾病病程生物标志物的挖掘,为后续疾病的诊断及预后提供了理论基础。

关键词:森林脑炎; 代谢组学; 液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 02. 008 **中图法分类号:**R512. 3

文章编号:1673-4130(2022)02-0167-05 **文献标志码:**A

Study on serum metabolomics of forest encephalitis patients by Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry^{*}

WANG Xiaoyan, LI Xiang, XIAO Xiang, LU Desheng, ZHANG Shihua, DU Yandan[△]

Inner Mongolia Forestry General Hospital/the Second Clinical Medical School,

Inner Mongolia Minzu University, Hulunbuir, Inner Mongolia 021000, China

Abstract:**Objective** To visually analyze the pathogenic mechanism of forest encephalitis using metabolomics technology and to find biomarkers related to the occurrence and development of the disease. **Methods** High performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF MS) technology was used to compare 59 forest encephalitis patients and 39 healthy persons, and biomarkers were screened out by multivariate statistical analysis. **Results** A total of 144 different metabolites were screened. Through the enrichment analysis of metabolic pathways, it was found that the differential metabolites covered a variety of amino acid pathways and lipid related metabolic pathways, including lipoprotein biosynthesis, arachidonic acid biosynthesis and leukotriene biosynthesis. **Conclusion** Mass spectrometry combined with multivariate statistical method could be used to find out biomarkers in disease course, which provides a theoretical basis for further diagnosis and prognosis of diseases.

Key words: forest encephalitis; metabolomics; Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry technology

森林脑炎是一种由蜱传森林脑炎病毒引起的发热性疾病,严重时会对中枢神经造成一定程度损伤^[1]。森林脑炎主要流行于欧洲及亚洲东北部林区,近年来随着生态旅游业的发展,感染人群范围持续扩大,严重影响人民健康及经济发展^[2]。森林脑炎是一种自抑性疾病,机体主要凭借自身抗炎作用进行自我修复,目前仍无特效治愈方式^[1,3],且病毒入侵机体产生的促炎及抗炎作用机制还未被揭示。代谢组学凭

借高通量技术和先进的数据分析方法,捕捉生物体内代谢通路变化,从而系统揭示机体的整个代谢变化,在系统科学中占据举足轻重的位置^[4-7]。笔者前期基于流式细胞技术分析了病毒侵染后机体与细胞免疫因子的相关性,为寻找与疾病病程相关的靶向标志物,笔者对森林脑炎患者和健康人群进行了代谢组学检测,并结合多元分析以阐释疾病发病机制,现报道如下。

^{*} 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08174)。

作者简介:王晓艳,女,主任技师,主要从事森林脑炎方向研究。 [△] 通信作者, E-mail:mdmzh-2008@126. com。

本文引用格式:王晓艳,李翔,肖翔,等. 基于质谱技术对森林脑炎患者血清代谢组学的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2): 167-171.

1 资料与方法

1.1 一般资料 50 例森林脑炎患者(森林脑炎组)为呼伦贝尔牙克石市附近居民,有蜱虫叮咬史,且出现发热、四肢疼痛等症状,经血清学检测,神经内科专家鉴定为森林脑炎。森林脑炎组中男 39 例,女 11 例;年龄 25~68 岁;IgG 或 IgM 抗体呈阳性。健康对照组为内蒙古林业总医院职工体检健康者 39 例,其中男 19 例,女 20 例;年龄 22~59 岁;IgG 或 IgM 抗体呈阴性。所有受试者均签署了知情同意书。

森林脑炎组纳入标准:符合《职业性森林脑炎诊断标准》^[8];外周血清特异性抗体 IgM 或 IgG 呈阳性,且 IgM 或 IgG≥1:20;年龄 18~70 岁。排除标准:近期有疫苗接种史;妊娠期、哺乳期。健康对照组纳入标准:特异性抗体 IgM 或 IgG 呈阴性。排除标准:有蜱虫叮咬史及森林脑炎疫苗接种史;患有其他疾病。

1.2 仪器与试剂 LC-30AD 液相色谱仪,日本岛津公司;Triple TOF 5600 质谱检测器,美国 AB Sciex 公司。甲醇(MEOH)、乙腈(ACN)试剂均为 Optimal MS 级别,美国 Fisher Chemical 公司生产;超纯水为屈臣氏超纯水;醋酸铵(纯度≥98%)、氨水(纯度 28%~30%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本前处理 取血清标本 300 μL,加入 900 μL 提取液[ACN:H₂O=4:1(V/V)],旋涡混匀 30 s,-20℃静置 1 h 后于 4℃,12 000 r/min 离心 15 min;小心取出 600 μL 上清液,等体积加入至两个独立的 EP 管中并在真空浓缩仪中干燥提取物;向干燥后的代谢物中加入 200 μL 提取液(提取液为初始梯度的流动相),旋涡 30 s。将标本于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,小心取出 75 μL 上清液于 2 mL

进样瓶上机检测。等体积血清标本各 3 μL,标本混合后为质量控制样(QC)。QC 标本随机穿插在标本序列中多次进样,以监测仪器与方法的稳定性。

1.3.2 检测分析 为了全面覆盖标本信息,采用非极性色谱柱及极性色谱柱进行生物标本的分离。针对中等极性及弱极性小分子化合物:色谱柱采用 Acquity HSS T3 Column(以下简称 T3 色谱柱,1.8 μm,2.1×100 mm),美国 Waters 公司;梯度洗脱采用流动相 A:H₂O(0.1% FA);B:MEOH:ACN=1:1(V/V)。流速为 0.3 mL/min;进样量为 5 μL;柱温为 40℃。梯度洗脱程序信息见表 1,质谱相关参数信息见表 2。

针对强极性小分子代谢物:色谱柱采用 Acquity UPLC BEH Amide Column(以下简称 BEH Amide 色谱柱,3 μm,2.1 mm×100.0 mm),美国 Waters 公司;梯度洗脱采用流动相 A:H₂O(25 mmol/L CH₃COONH₄+25 mmol/L NH₄OH);B:ACN。流速为 0.3 mL/min;进样量为 5 μL;柱温为 40℃。梯度洗脱程序信息见表 1,质谱相关参数信息见表 2。

表 1 梯度洗脱程序详细参数

BEH Amide 色谱柱		T3 色谱柱	
时间(min)	流动相 B 所占比例(%)	时间(min)	流动相 B 所占比例(%)
1.0	95	2.0	5
14.0	65	5.0	70
16.0	40	14.0	90
18.0	40	16.0	100
18.1	95	20.0	100
23.0	95	20.1	5
—	—	25.0	5

注:—表示无数据。

表 2 质谱详细参数

色谱柱类型	气帘气 (psi)	雾化气 (psi)	加热气 (psi)	电喷雾电压 (V)	加热气温度 (℃)	去簇电压 (V)	碰撞电压 ($\bar{x}\pm s$,V)
T3 色谱柱	35	60	60	5 500/-4 500	550	80	35±15
BEH Amide 色谱柱	40	55	55	5 500/-4 500	500	60	35±15

1.4 统计学处理 质谱采集到的 UPLC-QTOF-MS 图谱采用 Analyst Software(美国 AB Sciex 公司)导出原始数据,通过基峰离子流色谱图(BPC)及总离子流色谱图(TIC)等判断数据及平台的可靠性。随后利用 XCMS plus 及 Markerview 对采集到的潜在标志物进行定性及定量分析。将包含质荷比-保留时间、标本信息与峰面积三维数据进行校正后,将数据导入网络版 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst>.

ca/)进行数据的归一化、去除同位素等处理,并进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS)等多元统计分析,筛选潜在标志物,并归属相应代谢通路,以寻求代谢通路变化与疾病之间的相关性。

PCA 属无师监督法,该处理法则主要是对标本信息进行降维处理,能够实现标本分组的可视化分析,且不会造成重要信息的丢失,并对于建模的情况进行

评估^[9]。PCA 模型的建立主要用于评估实验建模的成功与否,其主要依据于 QC 标本的聚集程度, QC 标本随机穿插在进样序列中, QC 标本的聚拢程度可反映平台的可靠性及实验方法的重复性。 OPLS 主要依据多元统计变量 VIP 值、单变量 *P* 值及差异倍数 (FC) 法则,对于标本之间的代谢物进行筛选挖掘^[10]。筛选到的潜在标志物依据同位素模型分布原则、元素组成分析原则,缩小目标化合物范围,在标准谱库如京都基因和基因组数据库 (KEGG)、人类代谢组数据库 (HMDB) 进行进一步筛选,依据实际谱图与标准谱图的对比匹配系数,进一步确定物质属性。对于获得的潜在标志物进行代谢通路富集分析,建立通路变化

与生物背景之间的纽带,解释其生物学意义。

2 结 果

2.1 BPC 结果 血清标本正离子模式下基于 T3 色谱柱的图谱见图 1。从图中可以看出,色谱峰的峰型良好,进一步证实检测平台的可靠性。经 80% 去零规则消除缺失值,基于 T3 色谱柱正离子模式共鉴定到 166 个代谢物, BEH Amide 色谱柱正负离子模式下分别得到 181、182 个代谢物, 3 种模式下,去掉重复信号,共得到 410 个代谢物。

2.2 PCA 结果 从图 2 可以看出,基于 T3 色谱柱及 BEH Amide 色谱柱, QC 标本的聚集度均良好,表明建模的可靠性。

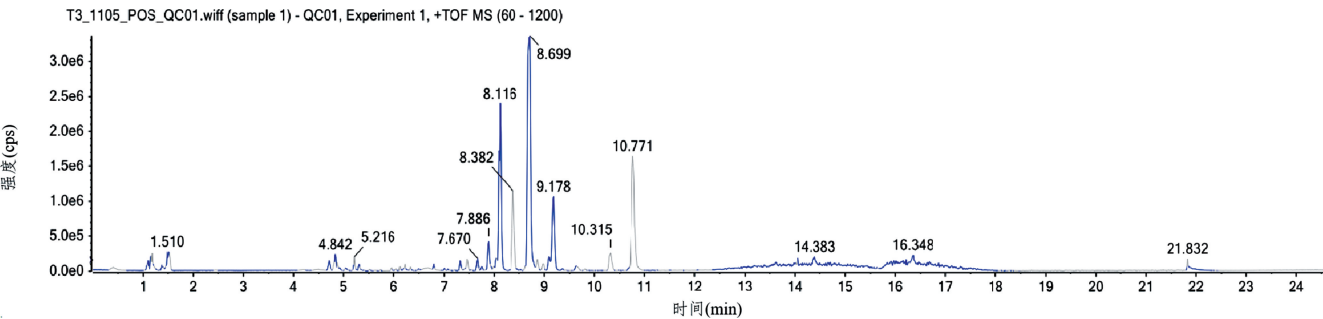
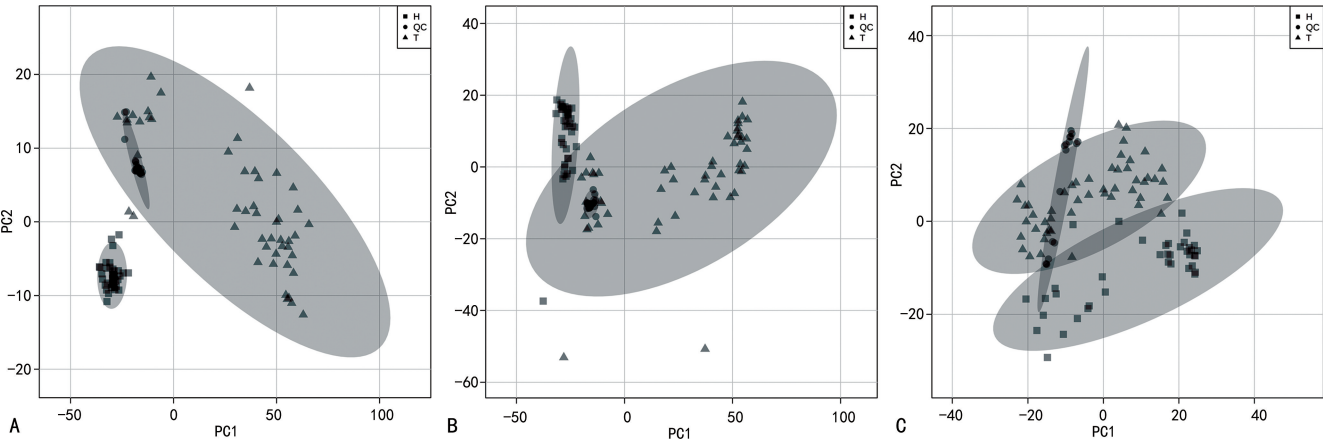


图 1 森林脑炎组血清标本正离子模式下基于 T3 色谱柱的基峰离子流色谱图



注: H 为健康对照组; QC 为质控组; T 为森林脑炎组; A 为 T3 色谱柱正离子模式下 PCA 图, 组成成分 PC1=67.2%, PC2=3.8%; B 为 BEH Amide 色谱柱正离子模式下 PCA 图, 组成成分 PC1=55.6%, PC2=9.1%; C 为 BEH Amide 色谱柱负离子模式下 PCA 图, 组成成分 PC1=21.1%, PC2=11.9%。

图 2 基于 UPLC-QTOF-MS 平台样品的 PCA 得分图

2.3 差异代谢物提取和解析 基于 UPLC-QTOF-MS 血清代谢组学技术,在森林脑炎组和健康对照组中可鉴定到 410 个代谢物,这些物质同时经二级谱库精确鉴定。利用 XCMS plus 及 METLIN 对生物学标志物进行筛选, MetDNA 进行物质鉴定,实现了拟靶向分析。其中 144 个代谢物在两组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$, $VIP>1$, $FC>1.0$), 所涵盖的差异代谢物中,氨基酸水平整体呈下降趋势,且脂肪酸水平同样表现为下降趋势。通过代谢通路富集分析,

差异代谢物主要涵盖了氨基酸、脂肪酸、花生四烯酸、白三烯等物质,所富集代谢通路主要为氨基酸代谢通路及与脂类代谢密切相关的代谢通路(包括脂蛋白生物合成、脂肪酸合成、花生四烯酸生物合成、白三烯生物合成等)。两组间主要差异代谢物见表 3。

表 3 健康对照组与森林脑炎组的主要差异代谢物				
分子式	名称	<i>P</i>	VIP	AUC
C18H30O2	α -亚麻酸	<0.05	6.78	0.99
C8H20NO6P	甘油磷酸胆碱	<0.05	6.04	0.86

续表 3健康对照组与森林脑炎组的主要差异代谢物

分子式	名称	P	VIP	AUC
C16H17NO3	S 型去甲乌药碱	<0.05	5.21	0.97
C4H7N3O	肌酸酐	<0.05	5.19	/
C26H43NO5	甘氨酸脱氧胆酸	—	3.97	—
C6H10O3	3-甲基-2-氧戊酸	<0.05	3.04	0.87
C2H7NO3S	牛磺酸	<0.05	2.65	0.83
C18H34O4	9,10-二羟基-12Z-十八烯酸	<0.05	2.31	0.99
C16H29O3	16-Oxo-棕榈酸酯	<0.05	2.26	0.99
C33H36N4O6	胆红素	<0.05	2.21	0.96
C18H32O3	9-(2-联苯基)-10-甲基吡啶高氯酸盐	<0.05	2.14	1.00
C18H34O2	反油酸	—	2.04	—
C18H34O2	油酸	—	2.04	—
C18H34O2	异油酸	—	2.04	—
C9H17NO4	L-乙酰胺碱	—	1.54	—
C8H8O4	3,4-二羟基苯乙酸甲酯	—	1.38	—
C18H32O2	亚油酸	<0.05	1.31	0.99
C9H16O4	壬二酸	<0.05	1.31	0.99
C11H9NO2	吡啶乙酸	—	1.19	—
C20H32O2	花生四烯酸	—	1.19	—
C5H4N4O	次黄嘌呤	<0.05	1.07	0.84
C20H30O3	白三烯 A4	<0.05	1.04	0.96
C26H43NO5	氧胆酸	<0.05	1.03	0.94

注：/表示此项未做；—表示此项无数据。

3 讨 论

本研究结果表明,差异代谢物主要集中于氨基酸、脂肪酸、花生四烯酸、白三烯等物质,所富集代谢通路主要为氨基酸代谢通路,另外也发现了与脂类代谢密切相关的代谢通路,包括脂蛋白生物合成、脂肪酸合成、花生四烯酸生物合成、白三烯生物合成。脂肪酸合成、花生四烯酸合成、白三烯生物合成通路代谢紊乱与机体对病毒入侵所做出的免疫反应有着直接联系^[11]。氨基酸水平整体呈下降趋势,这与大量病毒的入侵有关,病毒在机体内大量繁殖,需借助机体内氨基酸作为基底物质维持其生长,供自身细胞蛋白合成代谢所需^[12]。同时,本研究监测到脂肪酸水平呈下降趋势,这主要与宿主机体的机能有关,病毒在机体的复制、繁殖都需要能量供应,导致脂肪酸水平的降低。另外,脂质是细胞膜的主要组成成分,细胞膜的正常运行能够保证细胞内环境的相对稳定,使各种生化反应能够有序运行。病毒的入侵扰乱了机体的正常代谢,细胞做出相应的应激反应,细胞膜流动性发生了改变,从而导致脂类代谢紊乱^[13]。

内源性花生四烯酸的产生主要是通过细胞膜磷

脂的释放来实现的。这一过程由磷脂酶 A2 家族酶催化,并由多种细胞激活信号诱导,包括炎症或感染驱动的肿瘤坏死因子受体和 Toll 样受体 4 的刺激^[14]。花生四烯酸的代谢对于人体健康和组织稳态调节具有重要意义。花生四烯酸参与调节细胞膜灵活性和流动性,在细胞信号传导中作为脂质第二信使,诱导血管舒张及炎症介质产生,参与病毒入侵过程机体出现的炎症反应^[15-16]。

病毒的复制依赖于宿主的代谢机制和必要的细胞因子。氨基酸在所有病毒相关感染的发病机制中都发挥着重要作用,它们既是蛋白质合成的基底物,又是许多代谢途径的调节因子^[17-18]。有研究发现,氨基酸的代谢与慢性肝病存在紧密联系,其中支链脂肪酸如缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸等水平在患病组中呈现下降趋势,这可能与丙型肝炎病毒侵染组织并在组织中大量繁殖有关^[19]。花生四烯酸及其衍生物能够参与多种代谢途径,将免疫与脂质代谢联系起来,蚊虫叮咬人体后,机体会发生复杂的免疫应答以抵御病毒入侵,患者常会出现相应的炎症反应。急性炎症反应一般包含起始阶段和消退阶段,临床表现为发热、肿胀、疼痛和最终功能丧失等。炎症的起始和消退主要由某些化学物质控制,包括蛋白质、肽和脂类物质(脂类主要包括白三烯和前列腺素等物质)^[20],森林脑炎患者体内花生四烯酸等脂类物质发生明显变化,证实了这一观点。

代谢组学作为基因组学、蛋白组学的下游研究技术,与表征、现象之间的联系更加紧密。病毒侵染机体后,会在体内进行侵染-复制整个过程,机体则会呈现促炎-抗炎等炎症反应。目前关于森林脑炎的代谢过程及机制还未被完全解读,本研究基于代谢组学技术深入剖析森林脑炎的整个机制,将机体炎症反应与代谢特征联系起来,系统挖掘代谢机制,为疾病的诊断及预后提供了基础依据,为后续研究打下了坚实的理论基础。

参考文献

[1] RUZEK D, AVSIC Z T, BORDE J, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines[J]. Antiviral Res, 2019, 164: 23-51.

[2] SUN R X, LAI S J, YANG Y, et al. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2017, 8(4): 631-639.

[3] JEFFRIES C L, MANSFIELD K L, PHIPPS L P, et al. Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain[J]. J Gen Virol, 2014, 95(5): 1005-1014.

[4] NICHOLSON J K, LINDON J C. Systems biology: meta-

- bonomics[J]. *Nature*, 2008, 455: 1054-1056.
- [5] ZAMPIERI M, SEKAR K, ZAMBONI N, et al. Frontiers of high-throughput metabolomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 36: 15-23.
- [6] CHEN X, YU D. Metabolomics study of oral cancers[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(2): 22-27.
- [7] LIU R, HONG J, XU X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention[J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 859-868.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 职业性森林脑炎诊断标准: GBZ 88-2002[S/OL]. [2021-01-05]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/pyl/201212/34564.shtml>.
- [9] STEWART S, IVY M A, ANSLYN E V. The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines[J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(1): 70-84.
- [10] WORLEY B, POWERS R. Multivariate analysis in metabolomics[J]. *Curr Metabol*, 2013, 1(1): 92-107.
- [11] KESHAVARZ M, SOLAYMANI-MOHAMMADI F, NAMDARI H, et al. Metabolic host response and therapeutic approaches to influenza infection[J]. *Cell Molecul Biol Lett*, 2020, 25(4): 15-23.
- [12] SANCHEZ E L, LAGUNOFF M. Viral activation of cellular metabolism[J]. *Virology*, 2015, 479/480: 609-618.
- [13] CHEN W, LI X M, LI A L, et al. Hepatitis C virus increases free fatty acids absorption and promotes its replication via down-regulating GADD45alpha expression[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2347-2356.
- [14] DENNIS E A, CAO J, HSU Y H, et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention[J]. *Chem Rev*, 2011, 111(10): 6130-6185.
- [15] BRASH A R. Arachidonic acid as a bioactive molecule[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(11): 1339-1345.
- [16] TALLIMA H, EL RIDI R. Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits-a review[J]. *J Adv Res*, 2018, 11: 33-41.
- [17] 许丹丹, 何艮. 氨基酸感知与代谢调控的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(2): 342-351.
- [18] REEDS P J. Dispensable and indispensable amino acids for humans[J]. *J Nutr*, 2000, 130(7): 1835-1840.
- [19] GAGGINI M, CARLI F, ROSSO C, et al. Altered metabolic profile and adipocyte insulin resistance mark severe liver fibrosis in patients with chronic liver disease[J]. *Intern J Molecul Sci*, 2019, 20(24): 6333-6342.
- [20] SPITE M, CLARIA J, SERHAN C N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases[J]. *Cell Metabol*, 2014, 19(1): 21-36.

(收稿日期: 2021-03-24 修回日期: 2021-08-13)

(上接第 166 页)

- [12] CHEN T, XU W, WU D, et al. Mutational and phenotypic spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Zhejiang Province, China[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17137.
- [13] 吕金峰, 候方, 王伟青, 等. 2013—2019 年青岛市新生儿高苯丙氨酸血症筛查情况及基因突变分析[J]. *山东医药*, 2020, 60(23): 76-78.
- [14] 赵振东, 黄慈丹, 许海珠, 等. 海南省 380 996 名新生儿苯丙酮尿症筛查及苯丙氨酸羟化酶基因分析[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(26): 2054-2058.
- [15] 胡海利, 李卫东, 邵子瑜, 等. 72 例安徽地区高苯丙氨酸血症患儿苯丙氨酸羟化酶基因变异观察[J]. *山东医药*, 2018, 58(3): 70-72.
- [16] 唐新华, 陈红, 章印红, 等. 云南地区汉族苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(2): 153-157.
- [17] 何江, 徐发亮, 王惠珍, 等. 青海地区汉族苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2015, 26(6): 512-517.
- [18] 张学红, 杨莉, 陆彪, 等. 苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的研究[J]. *临床儿科杂志*, 2016, 34(8): 596-601.
- [19] WANG L, WANG X, HE B, et al. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene and prenatal diagnosis of phenylketonuria in Shaanxi, China[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 30(12): 1305-1310.
- [20] 侯丽青, 冀云鹏, 朱博, 等. 内蒙古地区汉族 PKU 患儿苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. *中国妇幼健康研究*, 2020, 31(4): 464-469.
- [21] 张璋, 张立琴, 杜玮, 等. 苯丙氨酸羟化酶缺乏症患者基因型和表型关系及其临床应用的研究[J]. *临床儿科杂志*, 2020, 38(9): 671-678.
- [22] LI N, JIA H, LIU Z, et al. Molecular characterisation of phenylketonuria in a Chinese mainland population using next-generation sequencing[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(2): 15769.
- [23] ZHU T, QIN S, YE J, et al. Mutational spectrum of phenylketonuria in the chinese han population: a novel insight into the geographic distribution of the common mutations[J]. *Pediatr Res*, 2010, 67(3): 280-285.

(收稿日期: 2021-03-12 修回日期: 2021-08-18)