

儿童哮喘患者尿液中小分子代谢物分析

陈 黎 王淑玲 孔令万 黄 勋 姚俊丽 苟小军 刘 华

摘 要 **目的** 采用基于气相色谱质谱联用 (GC/MS) 的代谢组学技术研究儿童哮喘患者尿液中小分子代谢物的变化。**方法** 取 50 例儿童哮喘患者尿样及 49 例年龄、性别匹配的正常儿童尿样,用 GC/MS 技术检测尿液中的小分子代谢物,应用正交偏最小二乘法 (OPLSA) 的方法,观察正常儿童对照组和儿童哮喘组的代谢轮廓差异。**结果** 正常儿童对照组和儿童哮喘组的代谢谱能明显的区分,利用商业化的代谢物谱库 (如 Wiley 和 NIST 质谱库) 及本实验室建立的标准品代谢物谱库鉴定了 18 个差异代谢物。与正常儿童对照组比较,儿童哮喘患者磷酸盐、L-苏氨酸含量降低;丁二酸、L-脯氨酸、 β -D-呋喃木糖、肌酐、2,3-二羟基丁酸、苯乙酸、D-阿拉伯糖、1H-吡啶、木糖醇、 α -L-吡喃甘露糖、苯乙酸、 α -L-吡喃甘露糖、甘氨酸、D-葡萄糖、肌醇、尿酸、马尿酸、1H-吡啶-3-乙酸含量升高。结合代谢途径分析发现,儿童哮喘患者体内存在能量代谢、肠道菌群代谢、氨基酸代谢等代谢异常。**结论** 基于 GC/MS 的代谢组学技术能全面客观地反映儿童哮喘患者体内尿液中的代谢物变化,潜在的代谢标志物分析及代谢途径探讨将为儿童哮喘的诊断和发病机制研究提供一个可借鉴的思路和手段。

关键词 代谢组学 气相色谱质谱联用 儿童哮喘 尿液 生物标志物

中图分类号 R725.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.018

Analysis on Small Molecule Metabolites in Urine of Patients with Childhood Asthma. Chen Li, Wang Shuling, Kong Lingwan, et al. Department of Pediatrics, Baoshan District Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine of Shanghai, Shanghai 201999, China

Abstract **Objective** To investigate the characteristics of urine metabolites in children with asthma. **Methods** 50 patients of children with asthma and 49 age, sex matched volunteers were enrolled and their urine samples were collected with GC/MS. Orthogonal—Projection to Latent Structures (OPLS) were performed to detect the metabolic profile difference between the children with asthma and control group. **Results** Children with asthma can be precisely distinguished from normal children in the control group. 18 differences in metabolites were identified using commercial metabolite library (such as Wiley and NIST mass spectral library) and the establishment of the laboratory's standard library metabolites. Compared with normal children in the control group, levels of phosphate, L-threonine were decreased; while the levels of succinic acid, L-proline, β -D-xylofuranose, creatinine, 2,3-hydroxybutyric acid, phenylacetic acid, D-arabinose, 1H-indole, xylitol, α -L-mannopyranosyl, phenylacetic acid, α -L-mannopyranosyl, glycine, D-glucose, inositol, uric acid, hippuric acid, 1H-indole-3-acetic acid were increased. in children with asthma group. With analysis of metabolic pathway, the dysfunction of energy metabolism, intestinal flora metabolism, amino acid metabolism and other metabolic abnormalities were found in vivo with children with asthma. **Conclusion** Work shows that metabonomics based on GS/MS can be used to comprehensively and objectively reflect the changes in the body of metabolites in the urine of children with asthma. The analysis of underlying metabolic markers and metabolic pathway will provide a draw ideas and methods for clinical diagnosis and pathogenesis of asthma study.

Key words Metabonomics; Gas chromatography-mass spectrometry; Childhood Asthma; Urine; Biomarker

支气管哮喘 (bronchial asthma) 简称哮喘, 是儿童最常见的气道慢性炎症性疾病, 发生率正呈现逐年上升趋势^[1]。陈秀英^[2]调查了 2012~2013 年东莞地区

12321 例儿童, 确诊东莞地区儿童哮喘发生率为 1.91%, 较 2012 年发生率明显升高。目前国内外研究者对哮喘的病因及发病机制进行了深入的研究, 认为哮喘是遗传与环境等多因素参与的慢性气道炎性疾病, 但其确切的发病机制尚不完全清楚。代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后 (如某个特定的基因变异或环境变化后) 其代谢产物本身的改变或随时间的变化, 来研究生物体系的代谢途径的一种技术^[3]。代谢组学检测某一生物体液或细胞提取物、细胞培养液及组织代谢物质变化, 通过多维统计

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473475); 上海市宝山区科技创新专项基金资助项目 (12-E-20); 上海市卫生和计划生育委员会科研基金资助项目 (20154Y0148)

作者单位: 201999 上海市宝山区中西医结合医院内儿科 (陈黎、孔令万、黄勋、姚俊丽、刘华); 310036 杭州师范大学医学院 (王淑玲); 201999 上海市宝山区中西医结合医院药剂科 (苟小军)

通讯作者: 苟小军, 电子信箱: gouxiaojun1975@163.com; 刘华, 电子信箱: liuhuabsy1971@163.com

分析从而发现其内在联系,发现在某一疾病中代谢组学特征,从而获得诊断依据^[4]。

儿童处在生长发育的阶段,成年期疾病起源于儿童期,应用代谢组学的方法研究儿童个体的代谢差异,揭示生命早期及后期代谢状态关系,为健康预防和治疗疾病提供新的策略。因此,本研究采集哮喘儿童患者和正常儿童的尿样,运用 GC/MS 的代谢组学技术分析儿童哮喘患者尿中代谢物的变化,发现可作为生物标志物的内源性物质,为儿童哮喘的诊断和发病机制研究提供参考。

材料与方法

1. 研究对象:所有病例均来自于 2014 年 2 月 ~ 2015 年 12 月笔者医院中医儿科门诊患者。病例选择符合 2008 年中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的儿童支气管哮喘诊断标准^[5],本研究患者 50 例,其中男性 38 例,女性 12 例,患者平均年龄 7.44 ± 1.92 岁;49 例正常儿童作为正常对照组,其中男性 25 例,女性 24 例,平均年龄 7.45 ± 1.97 岁,两组在性别、年龄、病程等基本资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。排除其他原因引起的喘息(如肺炎、心脏病变等)、哮喘急性大发作、近 3 个月内参加其他药物临床试验的患者、正接受其他皮质激素或其他免疫抑制剂治疗者、伴有严重心、肝、肾、造血等系统原发性疾病及原发性免疫缺陷病、先天性呼吸道畸形、小儿结核病患者。本研究方案经笔者医院医学伦理委员会批准,所有研究对象均自愿参与监护人并签署了知情同意书。

2. 样品的采集:在样本收集前一天叮嘱患者食用清淡饮食,避免海鲜以及辛辣食物,并禁止采样前一天吸烟、饭酒,以减少食物对代谢造成的波动。样本的收集为提前预约实验人群,让实验人群到上海市宝山区中西医结合医院中医儿科门诊,用 50ml 量杯采集全部清晨第 1 次尿液,分别记录尿液总体积,混匀后吸取 10ml 置 10ml 离心管中密封,记录标号,立即于 -80°C 冰箱冷冻保存,同时记录患者的年龄、性别、体重等基本信息。

3. 试剂与仪器:N, O - bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA + 1% TMCS, 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号:LB67634); 尿素酶 (urease, 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号:SLBB0100V); 盐酸甲氧胺 (methoxyamine hydrochloride, 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司,批号:24AHO - SH); 2 - 氯苯丙氨酸、十七碳酸、吡啶、甲

醇以上皆为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

气相色谱/质谱联用仪 (GC/MS, 7890A/5975C, 安捷伦科技有限公司); 气相毛细管色谱柱 (HP - 5MS, 安捷伦科技有限公司); 烘箱 (上海福马实验设备有限公司); 低温冷冻冰箱 (U9260 - 020, 英国); 冷冻离心机 (5426, 德国); 微型漩涡混合器 (QL - 901, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 电子分析天平 (BS124S, 北京赛多利新仪器系统有限公司); 超纯水器 (Mill - Q II 型, Milipore, Bedford, MA, USA); 真空离心浓缩仪 (LNG - T83, 上海华美仪器仪表有限公司)。

4. 尿液样品预处理方法:实验前 2h 取出患者尿液样品,室温下解冻摇匀,取 1.0ml 尿液样品于离心管中,12000r/min 离心 10min; 取上清液 200 μl 于 2ml 离心管中,加入 150 个单位的尿素酶,振荡 30s, 在 37°C , 反应 1.5h 去除尿素;加入 1.7ml 甲醇、0.2mg/ml 的十七酸 60 μl 和 0.2mg/ml 2 - 氯苯丙氨酸 60 μl , 振荡 5min; 10000r/min 离心 10min; 取 1.5ml 上清液于玻璃管中, 50°C 真空离心浓缩至干。加入 60 μl 的甲氧胺,封盖,振荡 30s, 在 37°C 条件下反应 2h, 启盖; 加入 60 μl BSTFA + 1% TMCS, 封盖,振荡 30s; 在 37°C 条件下反应 90min, 振荡 30s 即可。

5. QC 样品制备:每个样品各取 20 μl , 混合并成一个样品,并进行分装,分装数量为:1 + 样品总数除以 10 (如有 50 个样品,则封装数量为 $1 + 50/10 = 6$ 个), 每个 QC 体系不得低于 100 μl 。然后按照尿液样品预处理方法的制备 QC 质控样品,每进样测试 5 个样品,进样 QC 2 次,监控仪器与样品检测状况。

6. 气相色谱/质谱 (GC/MS) 分析条件: (1) 色谱分析条件:将“尿液样品预处理方法”中得到的样品取 1 μl 于 GC/MS 色谱系统进样。色谱及质谱参数如下:系统载气及流速:分流比 20:1, 氦气 1ml/min, 电子碰撞电离:70eV, 全扫描范围 (m/z): 35 ~ 780, 进样口温度 280°C ; 离子源温度 250°C ; 接口温度 150°C ; 色谱柱升温程序见表 1。 (2) 质谱条件:溶剂延时 5min; 电离方式 EI; 电子能量 70eV; 质谱扫描范围 (m/z): 35 ~ 780; 全扫描方式。

表 1 GC/MS 色谱柱温箱升温程序

升温速率 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	恒温 (min)
	80	2
10	300	6

7. 数据处理与代谢物的鉴别:对上述检测的原始数据,通过 R 软件命令,完成基线校正,峰辩识,峰对齐及内标扣除和归一化等计算过程,最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度组成的三维矩阵表,将这个矩阵导入 SIMCA - P 11.0 软件 (Umetrics, Sweden) 中进行多维统计分析,通过模式识别,寻找造成样本聚集和离散的主要差异代谢物。利用商业化的代谢

物谱库 (如 Wiley 和 NIST 质谱库) 及本实验室建立的标准品代谢物谱,进行差异代谢物的鉴定。

结 果

1. 代谢指纹图谱宏观分析:比较正常儿童对照组、儿童哮喘组样本的典型尿液总离子色谱图,宏观上观察到这两组的代谢指纹图谱有明显的差异,两组间的一些谱峰强度有一定的差异,结果见图 1。

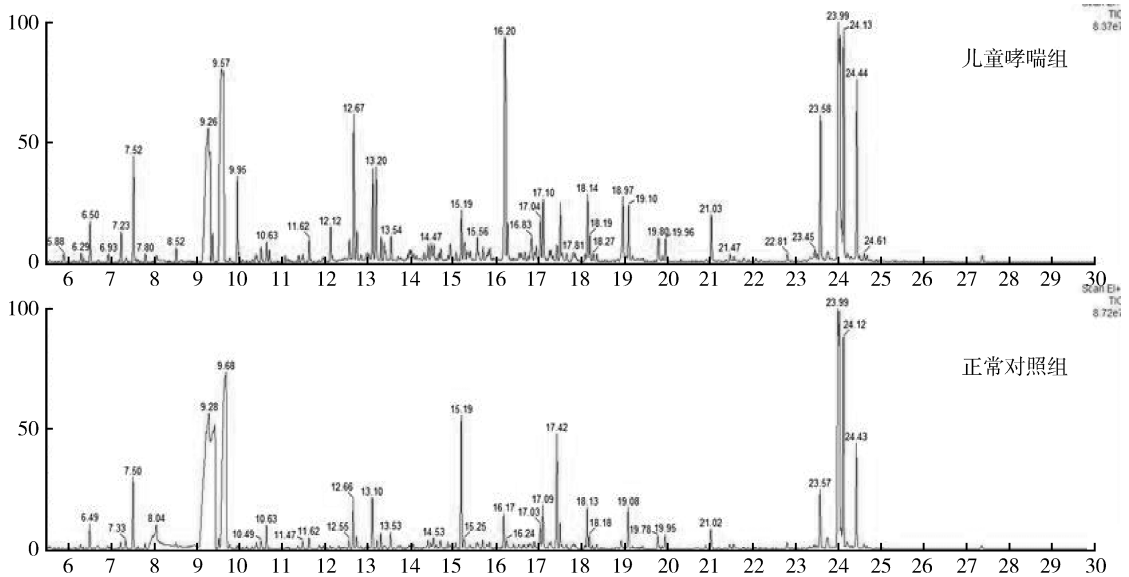


图 1 尿液 GC/MS 总离子流色谱图

2. 代谢谱分析:首先使用非监督的主成分分析法——PCA,分别分析了正常儿童、肺脾气虚和气阴两虚组的尿液代谢谱,结果显示,在无监督状态下各组尿代谢物谱不能明显区分,结果见图 2。为了进一步筛选与儿童哮喘发病相关的的关键变量,采用有监督的分析方法 OPLS 分析,该模型的结果显示两组间能完全区分开,并且该模型具有较高的解释率和预测率 ($R^2Y = 0.84$, $Q^2Y = 0.76$),结果如图 3 所示。

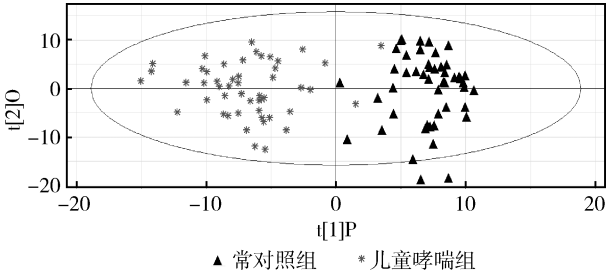


图 3 儿童哮喘组和正常对照组尿代谢 OPLS 得分图

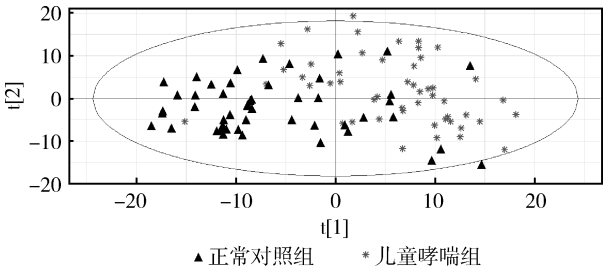


图 2 儿童哮喘组和正常对照尿代谢 PCA 得分图

3. 差异代谢物的分析:为了更好地找出反映病理状态下产生的差异代谢物,基于 OPLS 分析结果,在多维统计上依据权重系数 $VIP > 1$,相关系数的阈值

$|r| > 0.4$ (图 4),测得的差异表达代谢物,单维上进行验证 (t 检验, $P = 0.05$),通过 NIST 谱库的检索和自己建立的用户数据库的对照,鉴定了 18 个差异代谢物,并利用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库进行代谢通路研究以及进行了相对浓度单维上的变化情况的考察,结果见表 2。

讨 论

本研究采用 GC/MS 代谢组学方法,研究了儿童哮喘患者尿液内源性代谢物的特征,初步筛选 18 种生物标志物来标记儿童哮喘体内变化。有报道,儿童哮喘体内肠道菌群分布与健康儿童比较,有显著的差

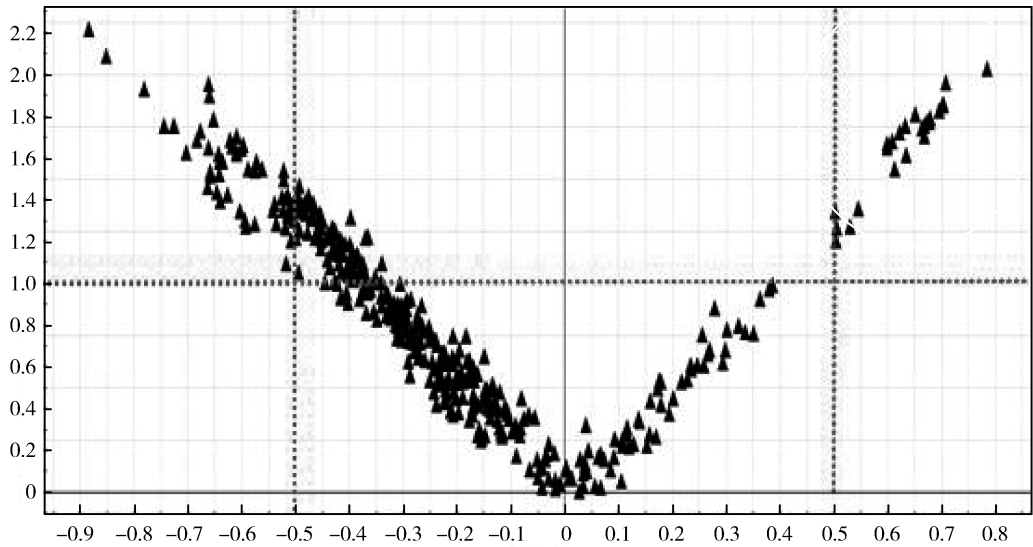


图 4 儿童哮喘组和正常对照组尿代谢 V - Plot 图

表 2 儿童哮喘和正常儿童尿样间的差异代谢物

代谢物	VIP	保留时间 (min)	比值	P	代谢通路
尿酸	1.34	18.96	+1.50	0.000	尿素循环
L - 脯氨酸	1.24	12.73	+1.55	0.000	氨基酸代谢
木糖醇	1.16	15.24	+1.58	0.000	能量代谢
D - 葡萄糖	1.35	17.08	+1.59	0.000	能量代谢
β - D - 呋喃木糖	1.15	12.84	+1.74	0.000	能量代谢
2,3 - 二羟基丁酸	1.66	13.24	+1.82	0.000	肠道菌群
1H - 吡啶 - 3 - 乙酸	1.05	19.89	+1.84	0.000	肠道菌群
肌醇	1.08	18.34	+1.86	0.000	能量代谢
1H - 吡啶	1.28	14.91	+2.03	0.000	肠道菌群
丁二酸	1.27	10	+2.10	0.000	肠道菌群
苯乙酸	1.65	14.05	+2.83	0.000	肠道菌群
肌酐	1.3	13.18	+3.12	0.000	能量代谢
α - L - 吡喃甘露糖	1.07	15.38	+3.88	0.000	能量代谢
D - 阿拉伯糖	1.44	14.52	+4.09	0.000	能量代谢
甘氨酸	1.34	16.25	+5.02	0.000	氨基酸代谢
马尿酸	1.34	19.19	+6.87	0.000	肠道菌群
磷酸盐	1.2	9.52	-1.44	0.000	能量代谢
L - 苏氨酸	1.96	11.03	-5.72	0.000	氨基酸代谢

+、- 分别表示与正常对照组比较,患者尿液中代谢物相对浓度升高和降低

别,该研究提示了肠道菌群与过敏性疾病发生有一定的相关性^[6,7]。过敏性疾病患儿肠道内乳酸杆菌及双歧杆菌较正常婴儿少,而大肠杆菌和金黄色葡萄球菌则较多,给予患儿口服双歧杆菌制剂,结果显示患儿的肠道菌群与免疫重新达到了平衡,哮喘的发作次数明显减少。上述研究提示肠道固有菌群的改变是哮喘等过敏性疾病发生、发展的易患因素。本研究

发现了一些含苯基的代谢物,包括丁二酸、2,3 - 二羟基丁酸、马尿酸、苯乙酸、1H - 吡啶 - 3 - 乙酸等在儿童哮喘患者中发生了紊乱。这些代谢产物主要是肠道菌群对酚类物质代谢产生的,表明肠道菌群在儿童哮喘发病过程中的发生了变化,说明患儿存在肠道菌群的紊乱^[8,9]。

本研究还发现苏氨酸在儿童哮喘体内显著降

低,脯氨酸、甘氨酸在儿童哮喘体内显著升高,表明氨基酸的代谢,在儿童哮喘发病过程中受到很大的影响。

GSH 是一种重要的抗氧化剂,起着控制肺中炎症反应的发生^[10]。GSH 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸在肝中合成的三肽,因此谷胱甘肽的变化直接导致甘氨酸的变化。据报道,肠黏膜需要吸收从体内组织转运来的谷氨酰胺等氨基酸作为能量物质,以维持肠道黏膜的完整性和肠道的正常生理功能,而谷氨酸是合成脯氨酸的必须物质^[11]。本实验中,脯氨酸显著变化,原因可能是谷氨酸合成脯氨酸导致的。

本研究发现磷酸盐、 β -D-呋喃木糖、肌酐、D-阿拉伯糖、木糖醇、 α -L-吡喃甘露、 α -L-吡喃甘露糖、D-葡萄糖、肌醇在儿童哮喘体内有显著性的变化,表明能量代谢在儿童哮喘发病过程中发生了异常变化。磷酸盐在体内具有重要的意义,决定细胞能量转换和代谢的作用。肌醇是真核细胞中第二信使的重要组成成分,肌醇还是一种组织渗透剂,常与细胞内钙离子浓度的调节、胰岛素信号转导和脂肪酸的氧化相关。肌醇的变化可能会影响细胞的能量代谢^[12]。葡萄糖是能量代谢糖酵解的中间代谢产物。木糖醇是人体糖类代谢的正常中间体,是一种天然五碳糖醇,木糖醇在体内通过葡萄糖醛酸-木酮糖侧路代谢,木糖醇代谢时除了和正常代谢途径一样产生能量以外,还有一部分变成肝糖原储存于肝脏,供机体所需的能量^[13]。

本研究发现儿童哮喘患者尿酸表现异常。尿酸是由次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下生成。在体内,嘌呤的分解代谢主要在肝脏、小肠和肾脏中进行,在这些脏器中的黄嘌呤氧化酶活性较强,尿酸产生后,由于人体内缺乏降解尿酸的尿酸分解酶,大部分尿酸主要以原形经肾小球滤过,肾小管重吸收和再分泌,最后通过尿液排出体外,小部分尿酸由肠系膜细胞分泌入肠腔排出^[14]。正常情况下,生物体内尿酸代谢维持在一个平衡状态,当尿酸代谢发生异常时导致多种疾病的发生^[15]。

综上所述,本实验使用 GC/MS 的代谢组学方法研究了儿童哮喘患者尿液内小分子物质的变化,结果分析显示,儿童哮喘的发生机制可能与能量代谢、肠道菌群代谢、氨基酸代谢等代谢异常有关。

参考文献

- 1 逯艳梅,曹廷. 复方异丙托溴胺雾化吸入治疗儿童哮喘急性发作的疗效观察[J]. 中国医药指南,2015,13(29):135-136
- 2 陈秀英. 东莞地区儿童哮喘患病情况调查分析和研究[J]. 中国城乡企业卫生,2015,5:102-104
- 3 喻琼琼,石冰. 孕妇补充叶酸与唇腭裂畸形发生的关系[J]. 国际口腔医学杂志,2014,41(3):368-370
- 4 陈达丽,彭丽珊,杨芄,等. 胎儿唇裂与唇腭裂产前超声诊断分析[J]. 武汉大学学报:医学版,2014,35(4):639-641
- 5 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. 中华儿科杂志,2008,46(10):745-753
- 6 孙夏烨,鲍一笑. 儿童哮喘与肠道菌群[J]. 国际儿科学杂志,2014,,4(3):233-236
- 7 Bjorksten B,Naaber P,Sepp E,et al. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children[J]. Clin Exp Allergy,1999,29(3):342-346
- 8 张慧晔,谢海辉,林立东,等. 一株白粉寄生菌的酚类代谢产物[J]. 热带亚热带植物学报,2009,17(1):77-79
- 9 Adriana Nowak, Zdzisława, Libudzisz. Influence of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria[J]. Anaerobe, 2006, 12(2):80-84
- 10 汤泰秦,丁勇,郑劲平,等. 广东省支气管哮喘流行病学调查分析[J]. 中华结核和呼吸杂志,2000,23(12):730-733
- 11 叶元土,王永玲,蔡春芳,等. 谷氨酰胺对草鱼肠道 L-亮氨酸、L-脯氨酸吸收及肠道蛋白质合成的影响[J]. 动物营养学报,2007,19(1):28-32
- 12 和红兵,石先哲,陈静,等. 气相色谱-质谱和液相色谱-质谱联用方法用于口腔癌代谢组学分析[J]. 色谱,2012,30(3):245-251
- 13 张松青,游鹏程,郑笈,等. 木糖醇在医药领域的应用[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(11):1582-1584
- 14 赵淑堂. 血尿酸与心血管疾病关系的研究进展[J]. 心血管病学进展,2007,28(3):472-474
- 15 刘代焱,姚昕韬,倪银星,等. 葡萄糖转运子 9 与尿酸代谢间关系的研究进展[J]. 中华内分泌代谢杂志,2012,28(1):81-84

(收稿日期:2016-01-28)

(修回日期:2016-02-19)

欢迎订阅

欢迎赐稿