

代谢组学应用与研究进展

李 鳌 孙宏伟 崔 彦

摘 要 代谢组学 (metabolomics) 作为系统生物学的重要组成部分, 定量对生物体内广谱代谢产物进行分析和发现不同状态下代谢产物的变化, 从而明确生物体不同代谢产物与相应生理、病理状态的关系。代谢组学研究经历了快速的技术进步, 已广泛应用于生命科学各个领域, 为诠释生命现象、探寻疾病机制、研发药物、发现生物学标志物等提供了强大的技术平台。随着代谢组学相关研究的不断深入以及环节升级与完善, 有望成为指导人类疾病诊断和治疗的有效手段。本文就代谢组学的特点、研究方法、应用以及在应激损伤、疾病研究中的作用做一综述。

关键词 代谢组学 创伤 药物 航天医学 生物学标志物

中图分类号 R365

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.01.036

英国研究者 Nicholson 等^[1] 基于磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 分析基础于 1999 年首次提出代谢组学这一概念。代谢组学研究拥有组学研究的“终点”之称, 近年来迅猛发展、被生物科学家寄予厚望, 目前被用作发掘多种疾病包括肿瘤的诊断、治疗相关代谢标志物, 阐释病理状态或揭示机体接受有关诊疗后的生物学表现, 并用于评价药物毒性、揭示其作用机制和药物相关基因功能等研究^[2]。本文将就代谢组学的特点、基础和临床应用的研究进展做一综述。

一、代谢组学的特点与研究方法

代谢组学 (metabolomics) 主要应用于探究相对分子质量很小 (<150) 的分子物质, 后者多为糖、脂质、蛋白质代谢过程的中间产物或最终产物, 这些小分子物质不仅能够说明细胞内部的生理代谢变化, 也表现出细胞接受环境污染物和药物等外界因素的影响^[1,2]。相关研究涉及各个领域, 分析技术也不断升级并逐渐完善。目前研究方法主要分为两类: (1) 基于磁共振的起源技术: 其具有不破坏样本的基础上快速准确分析的特点, 缺点是不够灵敏。(2) 色谱与质谱联用技术: 包含气相色谱/质谱 (GC-MS) 联用和质相色谱/质谱联用 (LC-MS) 技术^[3]。GC-MS 技术发展至今, 已建立了全面的代谢库, 因其对气体性小分子较敏感, 分辨率高, 在识别气性挥发性小分子中已作为

首选技术^[4]。LC-MS 适用于热不稳定、不易挥发且相对分子质量较大的物质^[5]。代谢产物经过检测、分析与鉴定后, 需进行后期数据分析处理, 分析方法包括主成分分析 (PCA)、非线性映射 (NLM)、聚类分析 (HCA) 等非监督法 (unsupervised method), 并联合监督方法 (supervised method) 最小二乘法 (PLS-DA)、人工神经网络 (ANN) 等方法, 其中应用最多的是 PCA 联合 PLS-DA 进行代谢物质的鉴定分析^[6]。

二、代谢组学在创伤修复与应激中的研究

Sara 等^[7] 进行热应激实验研究, 代谢组数据显示肝脏糖原分解和糖异生升高, 脂肪酸合成上调, 肝脏代谢过程中的糖原切割葡萄糖-1-磷酸 (G1P) 中间体升高, 包括葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 和葡萄糖; 脂肪酸除了肉豆蔻酸和棕榈油酸酯升高外, 大部分脂肪酸水平平均下调或未改变; 作为肝脏主要能源的氨基酸, 除了半胱氨酸外, 在热应激状态下表现下调。Kalkhof 等^[8] 收集伤口液进行代谢组学分析, 最终鉴定出超过 600 种蛋白, 其中 60 个与伤口愈合过程相关、18 种蛋白质参与体内平衡和血液凝固 (伤口愈合阶段 I)、35 种蛋白质与炎症或防御反应相关 (伤口愈合阶段 II)、19 种与蛋白水解和重塑 (伤口愈合阶段 III 和 IV) 相关, 此外, 还包括 4 种调控细胞死亡的蛋白质。研究结果显示, 金属蛋白酶 MMP-8 和 MMP-9、氧化应激标志物髓过氧化物酶 (MPO) 等可用作潜在伤口愈合的标志物。

另有研究表明, 小鼠肌腱损伤 1 周后, 代谢产物和中间体的¹³C 富集, 糖酵解和乳酸合成通量以及三羧酸循环活性均显著增加, 受伤 4 周后糖酵解和乳酸生成增加; 使用丙氨酸脱氢酶激酶抑制剂 (DCA) 处

基金项目: 全军试验技术研究计划重点项目 (SYFD1500128)

作者单位: 100083 北京, 安徽医科大学解放军第 306 医院临床学院普通外科 (李鳌、崔彦); 100083 北京, 中国人民解放军战略支援部队特色医学中心普通外科 (孙宏伟、崔彦)

通讯作者: 崔彦, 电子信箱: dryancui@aliyun.com

理 1 周及 4 周后乳酸生产均减少,伤口黏液、损伤肌腱的黏膜堆积和异位钙化减少,表明乳酸对于肌腱修复的重要性,可作为伤口修复的新靶点^[9]。Jonscher 等^[10]进行搭载飞船(space transportation system - 135)小鼠实验,发现肝脏脂滴中视黄醇含量明显减少,代谢组及基因组分析 mRNA 和代谢物变化,发现视黄醇丢失与过氧化物酶体增植物激活受体 α (PPAR α) 介导的通路激活以及肝星状细胞激活有关;结果还显示脂肪酸如 ω -3 脂肪酸、二十二碳六烯酸显著增加,胆汁酸如戊二酸上调、甘氨酸显著下调;代谢组学研究表明,长时间空间环境暴露对肝脏造成进行性应激性损害。Zheng 等^[11]将 30 只大鼠随机分为创伤脑损伤(TBI)组和假手术实验组,收集实验最初 24h 内大鼠血液样品进行 GC/MS 测量以评估急性 TBI 诱导的代谢变化,鉴定出血浆中 45 种代谢物,急性脑损伤组的脯氨酸、磷酸、 β -羟基丁酸、半乳糖、肌酸酐、L-缬氨酸、亚油酸和花生四烯酸等发生显著变化,通过单变量和多变量统计分析表明,上述 8 种血浆中的代谢物可作为 TBI 诊断的潜在生物学标志物。

近年来,研究发现,辐射暴露损伤小鼠的大部分代谢物在辐射暴露后的 3 个时间点都有不同程度减少,包含三羧酸循环(TCA)中间代谢物(富马酸、琥珀酸和氧戊二酸)、支链氨基酸(L-亮氨酸,L-异亮氨酸)、瓜氨酸和马尿酸等,而一小部分代谢物包括草酸、磷酸、L-苏氨酸、L-天冬氨酸和饱和游离脂肪酸(肉豆蔻酸和棕榈酸)在辐射处理组中显著升高;这些代谢物在辐射暴露后尿液中的相应变化显示出剂量与时间的相关性;比较辐射组与对照组,尤其是在高剂量组,除了少量存在于尿液样本中的代谢产物之外,代谢产物水平整体下调,进一步分析表明,泌尿代谢物排泄水平可以用来评估核暴露的辐射剂量,并能揭示与辐射损伤有关的代谢紊乱^[12]。Cheng 等^[13]通过过氧化氢(H_2O_2)处理肝癌细胞以模拟氧化应激,随后进行代谢组学分析发现,肝癌细胞中 1,6-二磷酸果糖(G6PD)以及 1,7-二磷酸七庚酮(S-1,7-BP)的水平显著升高,G6PD 活性缺乏降低二磷酸七庚酮的形成,推论二磷酸七庚酮是磷酸戊糖途径氧化应激反应过程中生成,结果显示,肝癌细胞经 H_2O_2 处理后显著增加了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺)的表达并降低了 ATP 和 NAD⁺ 的水平。Fuhrmann 等^[14]研究发现,缺氧 16h 和 72h 后谷氨酸、 α -酮戊二酸和异柠檬酸的水平降低;慢性缺

氧导致柠檬酸盐显著增加,而马酸盐却减少,表明在慢性缺氧条件下复合物 II 活性降低,电子转移黄素蛋白(ETF)升高,并且 ETF-泛醌氧化还原酶的变化影响了线粒体呼吸功能。上述一系列研究表明,应激可以对生物体在细胞和分子水平的代谢产生影响,最终表现为代谢产物的变化,通过研究细胞及代谢组学变化,可以直观了解阐述应激对于生命活动的影响及作用机制。

三、代谢组在疾病研究中的应用

代谢组学在基础研究和临床应用中发挥了越来越重要的作用,已广泛用于各种生物体不同功能状态和研究^[15]。Li 等^[16]采用超高效液相色谱-四重飞行时间质谱(UHPLC-QTOF/MS)技术相结合,收集 150 例严重阻塞性冠心病(CHD)患者和 150 例血管造影正常对照的血样研究组学成分,发现 105 例 CHD 患者的代谢物发生显著改变,代谢组学鉴定发现棕榈酸、亚油酸、4-吡哆酸、磷脂酰甘油、肉毒碱和石胆酸这 6 种代谢物与 CHD 具有强相关性。另一项基于 GC/TOFMS 对 30 例 2 型糖尿病患者和 30 例健康对照者的非靶向血清代谢前瞻性研究分析,应用多变量数据分析识别代谢物,结果有 54 种代谢物被鉴定出来,其参与氨基酸、碳水化合物、脂质、膜转运和核苷酸的代谢途径,其中龙胆酸、柠檬酸、琥珀酸、2-羟基丁酸和 3-羟基-1-脯氨酸在内的的代谢物与 2 型糖尿病之间高度相关,认为可作为潜在的生物学标志物^[17]。

Zhao 等^[18]采用超高效液相色谱-四重飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术分析 75 例原发性高血压以及健康对照者的尿液代谢产物,根据 PLS-DA 模式识别分析,筛选出其间存在显著差异的物质,涉及的代谢途径为氨基酸代谢、脂肪酸代谢类固醇激素、生物合成和氧化应激等,其中包括 L-蛋氨酸在内的 10 种代谢物可作为潜在的生物学标志物。另有研究者应用代谢组学技术研究分析乳腺癌和健康对照组的血浆样品,发现血浆中不同浓度的代谢物达 1269 种,分析认为乳腺癌患者的这些异常代谢物主要通过合成必需生物分子提供所需能量和构建细胞生长所需构架起作用,并发挥信号转导分子的作用^[19]。Fukumoto 等^[20]应用气相色谱/三重四极杆质谱法对鳞状细胞癌和黑色素瘤进行血清代谢组学研究,发现 118 种差异代谢物,在鳞状细胞癌组中具有显著差异的代谢物是甘油、4-羟基苯甲酸、癸二酸、岩藻糖和辛二酸,在黑素瘤组中,这些代谢物是谷氨

酸、癸二酸、辛二酸、4-羟基苯甲酸和苯丙氨酸,主成分分析显示可以将这两种皮肤恶性肿瘤群体与健康志愿者群体区分开来。Chen 等^[21]采用¹H 核磁共振光谱与拉曼光谱相结合分析高分化与低分化鼻咽癌细胞之间的代谢情况,筛选出 18 种特征代谢物,包括丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、牛磺酸和苏氨酸在内的 8 种氨基酸在高分化和低分化鼻咽癌细胞间比较差异有统计学意义。Wang 等^[22]通过 UHLC-MS 代谢组学技术分析肺腺癌细胞的代谢改变,发现尿苷一磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、二磷酸腺苷(ADP)、苹果酸、丙二酰辅酶 A、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、辅酶 A 等在内的 22 种代谢物表达异常,涉及核苷酸代谢、尿素循环、三羧酸循环和甘油磷脂代谢等途径异常。大量研究表明,代谢组学技术在多种疾病研究中的广泛应用正在大范围揭示一系列疾病的病理生理机制。

四、代谢组学在药物研究中的应用

代谢组学在评价药物毒性、揭示其作用机制和药物相关功能中具有独特作用,现已广泛运用于各种药物研究^[2,4]。Wu 等^[23]采用使用模式识别分析,研究当归四逆汤的相关作用,发现模型和对照组之间可以明确分离;当归四逆汤在干预血瘀过程中调节了 9 种代谢产物,认为滋补血液对温暖经络的作用有关,同时表明,当归四逆汤对血瘀综合征的干预作用可能涉及调节花生四烯酸、甘油磷脂、胆汁酸生物合成和丙酮酸代谢等途径。Ryu 等^[24]应用顺铂处理小鼠,然后对其血液及尿液进行代谢组学分析,发现丙氨酸、葡萄糖、甘氨酸、肌酐、乙酸盐和乳酸的尿浓度显著升高,而尿液代谢物中柠檬酸盐和马尿酸盐的浓度在顺铂处理后显著降低,通过血清和尿¹H NMR OPLS-DA 与血清生化及肾脏组织病理学改变的相关性分析,发现尿液¹H NMR 分析可用于预测/筛选顺铂肾毒性的可靠指标。

另有研究者通过对肝癌细胞使用新型潜在抗癌药物 Natrin 培养后进行代谢组学研究,主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)揭示了肝癌细胞代谢受到 Natrin 作用影响,13 种代谢物被鉴定为与 Natrin 诱导的细胞凋亡高度相关的潜在生物学标志物,部分代谢物对应了鞘脂代谢、脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢、甘油磷脂代谢和糖鞘脂代谢等 5 种代谢途径,证明了 Natrin 的抗癌活性^[25]。Yang 等^[26]用高脂饮食诱导血脂异常大鼠模型,中药黄精提取物(polygonatum kingianum, P. kingianum)灌胃

14 周,随后使用超高效液相色谱/质谱法对血清、尿液和肝脏样品中的代谢物进行分析,分别鉴定出 19、24 和 38 种潜在的生物学标志物,涉及苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、谷氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成以及色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、淀粉、甘油磷脂、花生四烯酸、亚油酸、烟酸、烟酰胺和鞘脂的代谢;研究发现黄精提取物通过调节血清、尿液和肝脏样品中的内源性代谢物来减轻高脂饮食诱导的大鼠血脂异常,认为其有望成为治疗血脂异常和相关疾病的脂质调节剂。纵观国内外有关药物毒性实验和新药研发热点问题,代谢组学技术以其高敏感度、准确性和直观反映细胞生命活动的特性而提供了良好的技术平台。

五、代谢组学在失重医学研究领域的应用

基于代谢组学分析技术的高通量、高分辨率、高敏感度等特点,也拓展应用于航天航空失重医学研究领域。Xu 等^[27]在模拟微重力环境中饲养大鼠 14 天诱导抑郁模型,随后采用主成分分析和正交偏最小二乘判别法寻找大鼠尿液内源性差异代谢产物,多变量统计分析显示微重力处理的大鼠和对照大鼠的尿代谢谱之间存在明显分离,其中柠檬酸、草酸琥珀酸、肌酸、脯氨酸、苯乙酰甘氨酸、5-羟基吡哆乙醛、琥珀胆碱、脱氧尿苷、3-羟基马尿酸、谷氨酰胺和 5-羟色氨酸等表达明显下调,而吡哆-模型组中 3-乙醛、黄尿酸、牛磺酸、犬尿喹啉酸、马尿酸、5-羟基吡哆乙醛、2-苯基乙醇葡萄糖苷酸、2-异丙基-3-氧代琥珀酸和肾上腺素水平显著升高,这些生化改变涉及色氨酸、精氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸代谢以及能量代谢,这为鉴别空间和重力引发的抑郁具有重要临床意义。Michaletti 等^[28]应用 UHPLC-HRMS 技术分析失重环境培养的人成骨细胞,发现微重力环境下糖酵解加速,主要与戊糖磷酸途径相关;苹果酸脱氢酶减少诱导苹果酸-天冬氨酸穿梭逆转,导致 ATP 合成失调;脂肪酸 β -氧化被抑制,促进甘油三酯生成和甘油梭减少;微重力促发氧化应激反应,氧化型谷胱甘肽和抗氧化酶显著降低;结论认为失重环境抑制成骨细胞功能,损害线粒体能量潜能和细胞能量状态。上述研究结果表明,代谢组学技术对促进航天航空失重医学发展具有重要意义,这方面的应用尚有限,有待深入研究。

六、展 望

综上所述,代谢组学研究经历了快速的技术进步,已广泛应用于生命科学各个领域,为诠释生命现象、探寻疾病机制、研发药物、发现生物学标志物等,

提供了强大的技术平台,展现了崭新的理论视角。代谢组学研究方兴未艾,因数据采集时间和数据大小等因素,尚难以在高通量条件下执行单细胞代谢组学,技术稳定性和代谢物覆盖度等亦需进一步完善。随着代谢组学相关研究的不断深入以及环节升级与完善,有望成为指导人类疾病诊断和治疗的有效手段。

参考文献

- 1 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181–1189
- 2 Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, *et al.* Systems biology and multi-omics integration: viewpoints from the metabolomics research community[J]. *Metabolites*, 2019, 9(4): E76
- 3 Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3:23
- 4 Everett JR, Loo RL, Pullen FS. Pharmacometabonomics and personalized medicine[J]. *Ann Clin Biochem*, 2013, 50(6): 523–545
- 5 Alder L, Greulich K, Kempe G, *et al.* Residue analysis of 500 high priority pesticides; better by GC – MS or LC – MS/MS? [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25(6): 838–865
- 6 Bjerrum JT. Metabonomics: analytical techniques and associated chemometrics at a glance[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1277: 1–14
- 7 Sara F, Jastrebski, Susan J, *et al.* Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181900
- 8 Kalkhof S, Förster Y, Schmidt J, *et al.* Proteomics and metabolomics for in situ monitoring of wound healing[J]. *Biomed Res Int*, 2014; 934848
- 9 Zhang K, Hast MW, Izumi S, *et al.* Modulating glucose metabolism and lactate synthesis in injured mouse tendons; treatment with dichloroacetate, a lactate synthesis inhibitor, improves tendon healing[J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(9): 2222–2231
- 10 Jonscher KR, Alfonso – Garcia A, Suhaimi JL, *et al.* Spaceflight activates lipotoxic pathways in mouse liver[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152877
- 11 Zheng F, Xia ZA, Zeng YF, *et al.* Plasma metabolomics profiles in rats with acute traumatic brain injury[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182025
- 12 Zhao M, Lau KK, Zhou X, *et al.* Urinary metabolic signatures and early triage of acute radiation exposure in model[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(4): 755–766
- 13 Cheng ML, Lin JF, Huang CY, *et al.* Sedoheptulose – 1,7 – bisphosphate accumulation and metabolic anomalies in hepatoma cells exposed to oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 5913635
- 14 Fuhrmann DC, Olesch C, Kurrel N, *et al.* Chronic hypoxia enhances

- β – oxidation – dependent electron transport via electron transferring flavoproteins[J]. *Cells*, 2019, 18, 8(2): E172
- 15 Lee MY, Hu T. Computational methods for the discovery of metabolic markers of complex traits[J]. *Metabolites*, 2019, 9(4): E66
- 16 Li Y, Zhang D, He Y, *et al.* Investigation of novel metabolites potentially involved in the pathogenesis of coronary heart disease using a UHPLC – QTOF/MS – based metabolomics approach [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15357
- 17 Wang H, Zhang H, Yao L, *et al.* Serum metabolic profiling of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults using an untargeted GC/TOFMS [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 477: 39–47
- 18 Zhao H, Liu Y, Li Z, *et al.* Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non – targeted metabolomics based on UPLC – Q – TOF/MS[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 486: 192–198
- 19 Jové M, Collado R, Quiles JL, *et al.* A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19522–19533
- 20 Fukumoto T, Nishiumi S, Fujiwara S, *et al.* Novel serum metabolomics – based approach by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for detection of human skin cancers: candidate biomarkers[J]. *J Dermatol*, 2017, 44(11): 1268–1275
- 21 Chen Y, Chen Z, Su Y, *et al.* Metabolic characteristics revealing cell differentiation of nasopharyngeal carcinoma by combining NMR spectroscopy with Raman spectroscopy[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 37
- 22 Wang Y, Wang CH, Zhang YF, *et al.* UPLC – MS – based metabolomics reveals metabolic dysregulation in ALDH1A1 – overexpressed lung adenocarcinoma cells[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(4): 52
- 23 Wu JX, Zheng H, Yao X, *et al.* Danggui – Sini Decoction on a blood stasis syndrome rat model using untargeted metabolomics[J]. *Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1105: 164–175
- 24 Ryu SH, Lee JD, Kim JW, *et al.* ^1H NMR toxicometabolomics following cisplatin – induced nephrotoxicity in male rats [J]. *Send to J Toxicol Sci*, 2019, 44(1): 57–71
- 25 Lu S, Lu R, Song H, *et al.* Metabolomic study of natrin – induced apoptosis in SMMC – 7721 hepatocellular carcinoma cells by ultra – performance liquid chromatography – quadrupole/time – of – flight mass spectrometry[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 1264–1273
- 26 Yang XX, Wei JD, Mu JK, *et al.* Integrated metabolomic profiling for analysis of antilipidemic effects of Polygonatum kingianum extract on dyslipidemia in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(48): 5505–5524
- 27 Xu T, Lu C, Feng L, *et al.* Liquid chromatography – mass spectrometry – based urinary metabolomics study on a rat model of simulated microgravity – induced depression[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 165: 31–40
- 28 Michaletti A, Gioia M, Tarantino U, *et al.* Effects of microgravity on osteoblast mitochondria: a proteomic and metabolomics profile [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15376

(收稿日期:2019 – 04 – 24)

(修回日期:2019 – 05 – 05)