

基于液质联用技术的 HIV/AIDS 患者 尿液代谢组学研究

马素娜, 许前磊, 谢世平*, 刘伟, 崔永霞
(河南中医学院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 探寻艾滋病及人类免疫缺陷病毒携带(HIV/AIDS)患者尿液的代谢组变化, 探讨代谢组学方法在预防和延缓 HIV 病毒感染者病程进展研究中的应用前景。方法: 运用液质联用技术(LC-MS), 检测 55 例 HIV/AIDS 患者和 20 例健康人的尿液代谢成分, 结合主成分分析(PCA)和 *t* 检验分析技术, 分析 HIV/AIDS 患者尿液的特异性代谢物质(或群谱)。结果: HIV/AIDS 患者组与健康对照组经代谢组学的方法在尿液代谢轮廓上得到了良好区分, 发现了 10 个可能存在的潜在生物学标记物。结论: 代谢组学的研究方法可以将 HIV/AIDS 患者与健康人进行良好的区分, 综合代谢标记物变化趋势构成了 HIV/AIDS 的代谢特征, 代谢组学的方法在预防和延缓 HIV 病毒感染者病程进展的研究中将有很好的应用前景。

[关键词] 代谢组学; 艾滋病; 主成分分析; 液质联用技术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0153-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1046.010.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:46

Research on Urine Metabonomics of HIV/AIDS Patients Based on HPLC-MS Technique

MA Su-na, XU Qian-lei, XIE Shi-ping*, LIU Wei, Cui Yong-xia
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate human immunodeficiency virus (HIV/AIDS) in urine of patients with metabolic changes and to explore future application value of metabonomics technique in research of preventing and delaying the acquired immunodeficiency syndrome. **Method:** Using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), urine metabolic components in 55 HIV/AIDS patients and 20 healthy human beings were studied by metabonomics method, and combined with principal component analysis (PCA) and *t* test analysis

[收稿日期] 20120508(334)

[基金项目] 国家“十一五”科技重大专项(2009ZX10005-21)

[第一作者] 马素娜, 硕士, 助教, 从事中医药防治感染性疾病的研究, Tel:0371-65676858, E-mail:907702957@qq.com

[通讯作者] * 谢世平, 博士, 教授, 从事中医药防治感染性疾病的研究, Tel:0371-65926508, E-mail:xspzz@126.com

[3] Luo Y B, Liu M, Xia Y, et al. Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloid isolated from Radix Linderae, on collagen-induced arthritis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10):726.

[4] Chen J Z, Chou G X, Wang C H, et al. Characterization of new metabolites from *in vivo* biotransformation of norisoboldine by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5):687.

[5] Chen J Z, Xu Y, Chou G X, et al. Simultaneous

determination of norisoboldine and its major metabolite in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(3):367.

[6] 陈建忠, 俞桂新, 王长虹, 等. 去甲异波尔多及其代谢产物的药理学与生物利用度研究[J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(6):473.

[责任编辑 邹晓翠]

technology, the specific metabolic substances (or group spectrum) were analyzed. **Result:** The urine metabolic profiles in the two groups showed differences with 10 potential biological markers. **Conclusion:** From the metabonomics method, HIV/AIDS patients and healthy people can be well differentiated. Comprehensive metabolic markers indicate HIV/AIDS metabolic characteristics. Metabonomics approach in the study of prevention and delay of HIV virus infection will have good prospects.

[**Key words**] metabonomics; acquired immune deficiency syndrome; principal component analysis; LC-MS

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,它从整体性观点出发,系统地研究生物体内源性代谢产物的变化及其发展规律,全面、即时地反映机体的变化,是后基因组时代一个重要的研究领域^[1-2]。近年来,代谢组学的研究方法越来越多地被运用到医药学研究领域^[3-9],在疾病的诊断、鉴别诊断、疾病危重程度的区分及药物疗效评价中,取得了相当的成果,并凸显出其独特的优势。

艾滋病,即获得性免疫缺陷综合征(acquired immynodeficiency syndrome, AIDS), HIV 属于反转录病毒科慢性毒属中的人类慢病毒组,变异性强。HIV 主要侵犯人体的免疫系统,包括 CD4⁺T 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞等,表现为 CD4⁺T 淋巴细胞进行性减少、CD4⁺/CD8⁺倒置,HIV 本身并不会引发任何疾病,当免疫系统被 HIV 破坏后,细胞免疫功能受损、缺陷,人体由于抵抗能力过低,丧失复制免疫细胞的机会,从而感染其他的疾病导致各种复合感染和肿瘤的发生直至死亡^[10]。由于 HIV 的特殊性,运用传统的分子生物学的方法来研究艾滋病存在一定的困难,而能体现出整体性、即时性、动态性研究特点的代谢组学的研究方法,可能成为研究艾滋病的一项新的技术手段。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 共纳入研究对象 75 名,其中 HIV/AIDS 患者(根据国家卫生部 2005 年推荐的《艾滋病诊疗指南》诊断标准为病人入组诊断标准)组 55 例,为来源于河南省南阳市某地区的 HIV/AIDS 患者,健康对照组 20 例,为同地区基本情况一致的健康人。两组年龄和性别等基线情况比较,无统计学差异。

1.2 样本的采集 用 EP 管收集研究对象的晨尿 2 mL,离心(4 000 r·min⁻¹,离心 10 min),取上清,放于 -20 ℃ 保存 1 周后转移至 -80 ℃ 冰箱备用。

1.3 试剂和仪器设备

1.3.1 试剂 乙腈(色谱纯级,Merck 公司),甲酸(HPLC/SPECTRO 级,Tedia 公司),甲醇(色谱纯级,

Merck 公司),高纯氮气(纯度 >99.99%),高纯氦气(纯度 >99.99%)。

1.3.2 仪器、设备 LCQ Advantage MAX 电喷雾离子阱液质联用仪(美国赛默飞世尔科技公司);色谱柱 Agilent Zorbax C₁₈(2.1 mm × 150 mm,3.1 μm),MR23i 高速冷冻离心机(法国 Jouan 公司),MDF5411 低温冰箱(日本 Sanyo),Mill-QSyntheSiS 型超纯水器(美国 Millipore 公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.4 尿液液质联用技术(LC-MS)检测分析方法 室温下解冻前期采集的尿液样本,精密移取上清液 300 μL,置 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL 甲醇,用混匀器混匀约 10 min,然后高速离心 10 min(14 000 r·min⁻¹,4 ℃ 控温),取上清液 800 μL,用 0.45 μm 滤膜过滤,即得供试品溶液。

1.4.1 液相色谱条件 流动相 0.2% 冰醋酸水-甲醇梯度洗脱;流速 0.2 mL·min⁻¹;进样盘温度 4 ℃;进样量 20 μL;柱温 30 ℃;色谱图采集时间 ≥ 60 min。洗脱梯度如表 1。

1.4.2 质谱条件 扫描方式一级全扫描,鞘气流速 40 bar,辅助气流速 10 bar,喷雾电压 4 kV,毛细管电压 -4 V,毛细管温度 300 ℃,质核比范围 80 ~ 1 000,采用负离子扫描模式。

表 1 液相色谱洗脱梯度

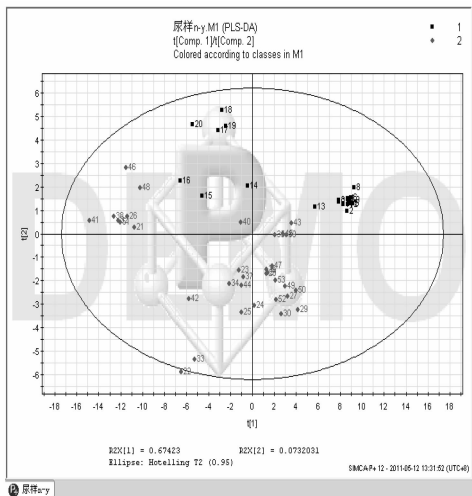
t/min	0.2% HAc/%	MeOH/%
0	60	40
3	60	40
10	20	80
25	10	90
60	10	90
60	10	90

1.5 数据分析方法 原始数据经液质联用仪自带软件通过谱图处理、基线校正、去偏置处理后以 Excel 进行数据的导出和贮存。对导出数据运用 SIMCA-P 12.0 软件包,采用主成分分析(principal

component analysis,PCA)、BRB-Tool 4.2 软件进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 HIV/AIDS 患者尿液的 LC-MS 谱图 PCA 分析 见图 1,2。



HIV/AIDS 病人组为 (◆);健康对照组为 (■)

图 1 正常组与 HIV/AIDS 组 PLS-DA (样品分布散点)

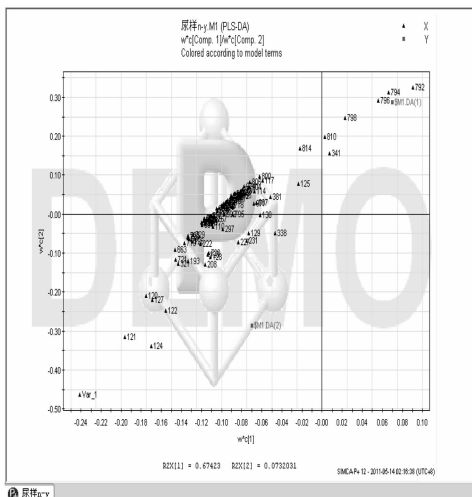


图 2 正常组与 HIV/AIDS 组 PLOT (载荷图或峰/化合物/变量分布)

图 1 表明,在 HIV/AIDS 组与健康对照组尿液 LC-MS 谱的得分图中,两组能够明显地区分开。但由于病人组 HIV/AIDS 不同的分期,该组样本主要集中在第 2 象限的左下方和第 3,4 象限区域(红色菱形◆标示),但 2 个区域相对各自较为集中;健康对照组的个体差异较大,样本点分布相对分散,样本主要集中在第 1 象限和第 2 象限的右上方区域(黑色方块■标示)。图 2 为相应的 PCA 载荷图,每个点代表了 1 个潜在的物质,若代表潜在物质的点偏离原点越远,就表明这个点对分类的贡献越大,也就

越有可能是潜在的特征代谢产物。

从 PCA 载荷图中选择出对分类贡献较大的潜在物质点,再用 *t* 检验的方法筛选出具有生物学统计意义的潜在代谢物质(或群)。

2.2 HIV/AIDS 患者尿液的 LC-MS 数据分析 见表 2,图 3。

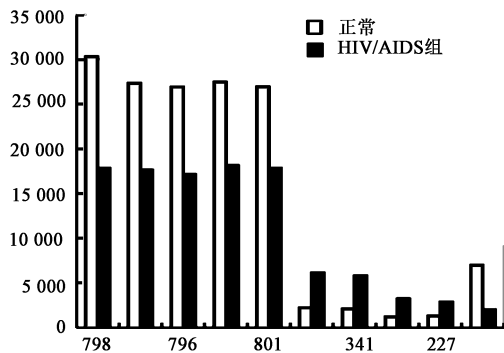


图 3 健康对照组与 HIV/AIDS 组同时存在的差异物质

m/z 为 798,797,796,799,801,381 的 6 种潜在物质在病人组的峰强度明显低于正常组,且相差 > 1.5 倍。*m/z* 341,227,222,338 的 4 种物质在病人组的峰强度明显高于正常组,两组经 *t* 检验均 < 0.05,存在明显差异,有统计学意义。

表 2 正常组与 HIV/AIDS 组中同时存在的差异物质 *t* 检验结果(质核比与峰强度)

<i>m/z</i>	健康对照组 峰强度(A)	HIV/AIDS 组 峰强度(B)	A/B	<i>P</i>
798	30 324.38	17 839.66	1.70	0.000
797	27 350.92	17 639.11	1.55	0.000
796	26 944.42	17 156.57	1.57	0.000
799	7493.31	18 152.71	1.51	0.000
801	26 953.61	17 845.05	1.51	0.000
341	2 076.55	5 782.02	0.36	0.022
227	1 279.46	2 844.67	0.45	0.023
222	1 189.82	3 218.17	0.37	0.035
338	2 218.71	6 119.77	0.36	0.039
381	6 974.25	1 999.63	3.49	0.044

3 讨论

本研究采用液质联用代谢组学的研究方法结合 PCA 主成分分析和 *t* 检验的分析技术,将 HIV/AIDS 患者组与健康对照组的尿液实现了良好的区分,并找出可能存在的潜在性标志物(或代谢物质群)。

由于多因素参与疾病的发病过程,HIV/AIDS 发病病因很明确,从初始感染 HIV 到终末期是一个漫长复杂的过程,而在这一过程中又有不同阶段的

划分,与 HIV 相关的临床表现亦是多种多样。根据 2011 年制定的《艾滋病诊疗指南》将艾滋病的全过程分为 3 期。①急性期通常发生在初感 HIV 后的 2~4 周,在此期最常见的临床症状为发热, CD4⁺T 淋巴细胞计数一过性减少, HIV 抗体则在感染数周后才出现。②无症状期可从急性期发展而来,也可以无明显的急性期症状而直接进入该期,一般为 6~8 年,在该期 HIV 病毒在感染者体内不断的复制, CD4⁺T 淋巴细胞计数逐渐下降,免疫系统明显受损,同时具有传染性。③艾滋病期为感染 HIV 的终末阶段,此期主要临床表现为 HIV 相关症状、各种机会性感染及肿瘤, CD4⁺T 淋巴细胞计数明显下降,多 <200/mm³, HIV 血浆病毒载量明显升高。虽然存在着明确的分期,但由于多种因素的影响,感染 HIV 病毒后,其在人体内潜伏期有长有短,有的患者可能终身携带而不发病,但有的患者感染后在很短的时间内就可能进入 AIDS 期^[10]。如何建立一种检测手段,科学地揭示、判断患者在某一阶段的代谢差异和功能状态,从而为有效地预防和延缓感染 HIV 病毒的患者进入艾滋病期的研究提供技术支持,是我们临床科研工作者高度关心和重视的问题。

代谢组学研究方法的出现为我们指明了方向,带来了希望。它是运用高通量、高分辨、高灵敏度的现代分析仪器(LC-MS、核磁共振)和分析手段(PCA 分析、偏最小二乘法分析等)定性、定量地研究生物体的内源性代谢产物(血浆、尿液、组织液等),结合化学信息学技术,分析生物体在不同状态下(如生理、病理、给药前后等)的代谢差异,获得相应的生物学标记物(或群)^[11],从而揭示生物体在某一阶段和环境下整体的功能状态,具有整体性、即时性、动态性的特点^[12-13]。其对于研究病情隐匿、变化复杂的疾病尤其具有独特的优势。本研究仅是运用代谢组学的方法对 HIV/AIDS 的一次探索,未对发现的潜在的可能差异物质(或物质群)做出定性、定量判断,对运用该方法进行 HIV/AIDS 的研究是一次有益的尝试,下阶段我们将着力于以上差异代谢小分子的定性和定量方面的研究,并与基因组学、转录组学、蛋白质组学及免疫学相联系,确定其代谢途径,阐述其调节机制,为 HIV/AIDS 的防治提供技术支持。

[参考文献]

[1] Nicholson J K, Lindon J C, 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.

[2] 危阳洋,王彩虹,李伟,等. 甲亢患者血清和尿液的核磁共振代谢组学研究[J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(2):279.

[3] 高鹏飞,刘卫红,吴俊珠,等. 代谢组学在中医药研究中的应用进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21):284.

[4] Kenny L C, Dunn W B, Ellis D I, et al. Novel biomarkers for preeclampsia detected using metabolomics and machine learning [J]. *Metabolomics*, 2005 (3):227.

[5] Brindle J T, Nicholson J K, Schofield P M, et al. Application of chemometrics to 1H-NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension [J]. *Analyst*, 2003,128(1):32.

[6] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999,29:1181.

[7] Shockey J P, Holmes E. Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002,2(1)35.

[8] Raina K, Serkova N J, Ararwal R. Silibinin feeding alters the metabolic profile in TRAMP prostatic tumors: 1H-NMRS-based metabolomics study [J]. *Cancer Res*, 2009,69(9) 3731.

[9] 邹忠杰,龚梦娟,谢媛媛,等. 氢化可的松诱导的肾阳虚大鼠尿液代谢组学研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(8):133.

[10] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南 2011 版 [C]. 北京:中华中医药学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国热带病学术会论文汇编, 2011:43.

[11] 张启云,李冰涛,徐国良,等. 肉桂水提物对正常大鼠尿液代谢物组的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010,16(17):164.

[12] 罗雪梅,王晨虹,刘大艳. 重度子痫前期患者的血浆代谢组学研究 [J]. *实用妇产科杂志*, 2011, 27(12):928.

[13] 许国旺,杨军. 代谢组学及其研究进展 [J]. *色谱*, 2003,21(4):316.

[责任编辑 何伟]