

· 药物代谢 ·

基于超高效液相色谱-飞行时间质谱的 CCl_4 诱导肝损伤 小鼠血浆代谢组学研究

陈汀¹, 姚卫峰¹, 张丽^{1*}, 丁安伟^{1, 2}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 利用代谢组学的方法研究不同剂量 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤模型, 确定能够表征 CCl_4 肝损伤模型的血浆代谢物中的生物标记物。方法: 采用基于超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)的代谢组学技术, 并结合主成分分析的方法, 研究正常小鼠和不同剂量 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠血浆代谢物组的变化。结果: 初步确定建立小鼠肝损伤血浆代谢物研究模型的 CCl_4 用量, 并寻找到 10 个具有特征性的内源性生物标记物。结论: 代谢组学方法成功用于 CCl_4 诱导的小鼠血浆肝损伤模型研究, 并为进一步研究中草药的保护肝脏作用奠定了基础。

[关键词] 代谢物组学; UPLC-TOF-MS; 肝损伤; 小鼠血浆; 生物标记物

[中图分类号] R285.5; R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0098-04

UPLC-TOF-MS Based Metabonomic Study of CCl_4 -induced Rat-plasma Liver Injury

CHEN Ting¹, YAO Wei-feng¹, ZHANG Li^{1*}, DING An-wei^{1, 2}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: Use the metabonomics method to study the CCl_4 -induced liver injury model, and discriminate the potential biomarkers contributed to liver injury in plasma metabolites. **Method:** Adopt the metabolic skills based on UPLC-TOF-MS and PCA, to research the change of plasma metabolite in normal rat or CCl_4 -induced liver injury rat with two different doses. **Result:** Ascertain the CCl_4 dosage in establish rat liver injury model of plasma metabolites and find ten characteristic biomarkers in plasma. **Conclusion:** Metabonomics method was successfully used to study the CCl_4 -induced liver injury model by the rat plasma, and laid a foundation for the further study of the liver protection of Traditional Chinese Medicine.

[Key words] metabonomics; UPLC-TOF-MS; liver injury; rat plasma; biomarker

[收稿日期] 20100831(004)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81001599); 科技部重大新药创制(2009ZX09103-339); 江苏省中医药管理局研究项目(LB09031); 南京中医药大学青年自然科学基金项目(09XZR14)

[第一作者] 陈汀, 硕士, 从事中药活性成分的基础及应用研究, Tel: 13770931747, E-mail: chenting85525@163.com

[通讯作者] * 张丽, 硕士生导师, Tel: 025-85811519, E-mail: zhangliguanxiong@163.com

代谢组学 (metabonomics) 作为系统生物学 (systems biology) 的一个分支, 是继基因组学、转录组学及蛋白质组学之后迅速发展起来的一门学科^[1]。其采用现代分析方法对动物或细胞特定生理时期内的所有相对分子质量较低的代谢物 (如氨基酸、脂肪酸、糖类、维生素和脂肪等) 进行定性和定量分析, 通过考察生物体系受到刺激或扰动后, 其代谢物组分或含量的变化来研究生物体系的代谢途径^[2]。 CCl_4 诱导的急性动物肝损伤模型是最经典

的实验性肝损伤模型^[3],是保肝药物研究的常用模型之一,其检测指标多为反映肝细胞损伤程度的酶学指标,如谷丙转氨酶及谷草转氨酶等^[4],但应用代谢组学进行相关的 CCl₄ 给药剂量的研究少有报道。本研究采用基于超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)的血浆代谢组学技术结合多变量数据分析的方法研究 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤模型。

1 材料

Waters AcquityTM UPLC 液相色谱仪(四元梯度泵-在线真空脱气机-自动进样器-二极管阵列检测器);Micromass Q-TOF microTM 四极杆-飞行时间质谱(电喷雾离子源-Lockspray);MassLynx V4.1 工作站;TGL-16B 高速离心机。

乙腈(色谱纯,Merck 公司);水为 Milli-Q 超纯水;甲酸(色谱纯,汕头市西陇化工厂有限公司);CCl₄(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

ICR 种小鼠,雄性,体重(20 ±2) g,清洁级实验动物,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。每日给予小鼠标准食物和饮用水各 2 次,实验开始前保持室内饲养 1 周。

2 方法

2.1 样品采集与制备 18 只小鼠,随机分为空白对照组、CCl₄ 肝损伤低剂量组(腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 10 mL·kg⁻¹)、CCl₄ 肝损伤高剂量组(腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 20 mL·kg⁻¹)。每组 6 只,分笼饲养。空白对照组腹腔注射生理盐水 10 mL·kg⁻¹,CCl₄ 肝损伤组分别腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 10, 20 mL·kg⁻¹,禁食不禁水,24 h 后眼眶取血,每只小鼠取血 0.5 mL,置于含 EDTA-2Na 的 Eppendorf 管中,血样 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,移取上清液 0.2 mL,加入乙腈 0.4 mL 混合均匀,静置 10 min 后 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.1.1 分析条件 色谱柱:ACQUITY-C₁₈ 柱(2.1 mm ×50 mm, 1.7 μm),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40,样品室温度保持为 7。流动相 A 液为 0.1% 甲酸溶液, B 液为乙腈,梯度洗脱程序(见表 1)。二极管阵列紫外检测器全波长扫描,紫外检测器流出液不经分流直接导入质谱系统检测。进样量为 5 μL。

质谱为 Waters 公司 Micromass Q-TOF microTM 四

极杆-飞行时间质谱,配有 Lock-spray 接口。ESI 离子源,采用正离子模式检测,脱溶剂气为 500 L·h⁻¹,脱溶剂气温度 300,锥孔气为 50 L·h⁻¹,源温为 110,毛细管电压 3 000 V,锥孔电压 50 V,微通道板电压为 2 500 V,每 0.4 s 采集 1 次谱图;准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(leucine - enkephalin, m/z 556.277 1) 溶液为锁定质量溶液。质量扫描范围 m/z 100 ~1 000。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
Initial	90	10
1	90	10
4	40	60
10	20	80
30	0	100
33	90	10
35	90	10

2.1.2 数据处理 数据采用 Waters MarkerLynx 4.1 软件进行色谱峰识别及峰匹配,并采用主成分分析法(PCA)对各组小鼠血浆的代谢物组进行分析。

3 结果及讨论

3.1 血浆代谢物的分析条件优化 本实验中 UPLC 采用 1.7 μm 的色谱柱填料使得在较高的线速度下依然可以保持良好的分离效率,并考虑到节省分析时间、提高分析通量及质谱系统对流量的耐受性,采用 0.4 mL·min⁻¹ 的流速,又可以不经分流将流出液直接导入质谱系统进行检测。图 1 是典型小鼠血浆 UPLC-TOF-MS 的基峰离子流色谱图,简称 BPI 图,在一个分析流程中可以检测到多种不同的体内内源性代谢物。经过峰识别和匹配,约 1 840 个峰的信息被采集用于进一步多变量数据分析以研究 CCl₄ 肝损伤模型。

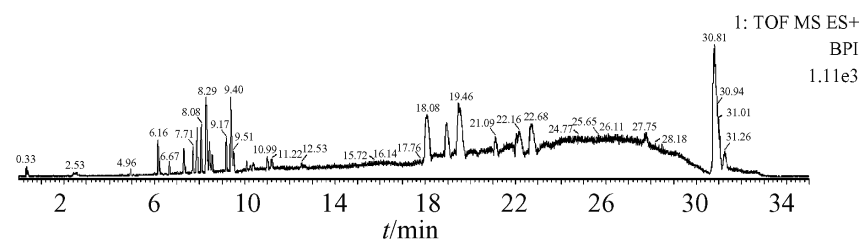


图 1 血浆内源性代谢物的 UPLC-TOF-MS 典型 BPI

3.2 CCl₄ 诱导小鼠肝损伤模型的建立 采用主成分分析的方法对空白组和 CCl₄ 肝损伤组小鼠的血浆代谢物指纹数据进行分析,绘制出反映组间离散程度的得分图(图 2)。由图上可以看出空白组和

CCl₄ 肝损伤组差异性显著, 被明显分为 2 类, 且不同剂量的 CCl₄ 肝损伤组与空白组之间的离散程度不同, 随着 CCl₄ 剂量的增加肝损伤组与空白组之间的离散程度逐渐变大。说明腹腔注射 CCl₄ 后小鼠血浆代谢物组发生了明显的变化, 且这种变化随着 CCl₄ 剂量的增加而有增大的趋势; 腹腔注射 CCl₄ 后小鼠正常生理代谢被干扰, 从血浆代谢物变化的角度可认为 CCl₄ 肝损伤模型造模成功。腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 10, 20 mL·kg⁻¹g 均可作为建立小鼠肝损伤血浆代谢物研究模型的 CCl₄ 用量, 故通过本实验初步认为采用腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 10 mL·kg⁻¹ 为建立小鼠肝损伤血浆代谢物研究模型的 CCl₄ 用量, 这也说明了参考文献所提供的小鼠肝损伤模型 CCl₄ 造模用量的正确性^[5]。

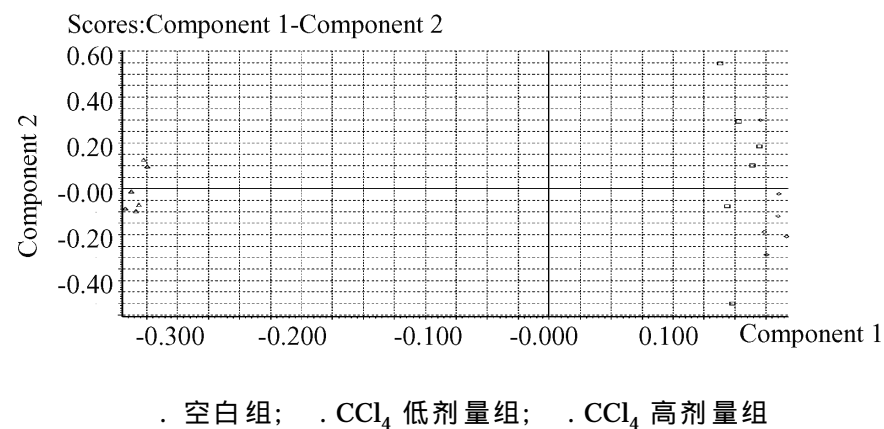


图 2 基于血浆代谢组学的 PCA 得分

3.3 CCl₄ 诱导小鼠肝损伤模型生物标记物的确定

图 3 是标示内源性代谢物离子对离散趋势贡献程度的载荷图, 其阐明了离子对分类的贡献程度, 其中对分类贡献最大的离子, 可被认为是 CCl₄ 对小鼠机体生理内源性代谢产生扰动的生物标记物, 兼顾在不同剂量 CCl₄ 破坏下小鼠血浆代谢产物含量变化不同, 结合以上两点, 找到了 10 个具有显著分类意义的生物标记物, 并跟踪了其在各组的的变化轨迹。

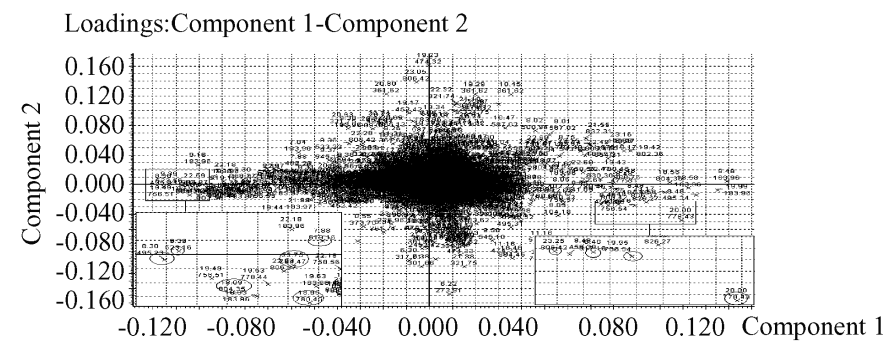


图 3 基于血浆代谢组学的载荷

对于以上 10 个物质进行进一步的鉴定, 根据保留时间和荷质比, 在总离子流图中找到其对应的峰, 再根据相应 m/z 值得到测定误差范围内相应化合物的元素组成和不饱和度, 通过分子式或相对分子质

量检索化合物数据库, 得到可能的化合物结构, 再结合 MS 数据筛选出最有可能的一种或几种化合物。其中 m/z 495 ($t_R = 8.29$ min), 519 ($t_R = 7.88$ min), 523 ($t_R = 9.38$ min) 的 3 个生物标记物在正离子模式下的 MS 图谱中有 m/z 184 和 m/z 104 的特征离子碎片 (图 4), 具有溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine) 的断裂特征^[6-8], 分别鉴定为 16 0, 18 2 和 18 0 溶血磷脂酰胆碱。其他生物标记物的信息见表 2。

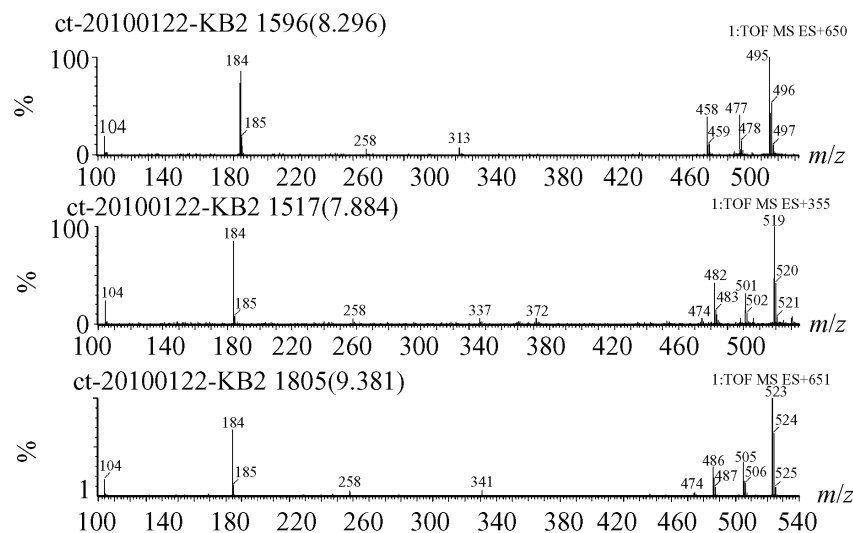


图 4 生物标记物 m/z 495 ($t_R = 8.29$ min), 519 ($t_R = 7.88$ min), 523 ($t_R = 9.38$ min) 质谱

表 2 小鼠血浆中特异性生物标记物信息

保留时间	[M+H] ⁺ /z	元素组成
19.951 1	756.535 6	C ₅₂ H ₇₀ NO ₃
20.002 0	778.431 8	C ₄₈ H ₆₀ NO ₈
23.253 4	806.415 0	C ₁₉ H ₅₆ N ₁₉ O ₁₆
18.091 5	804.350 9	C ₄₇ H ₄₆ N ₇ O ₆
22.746 1	784.470 4	C ₅₁ H ₅₈ N ₇ O
18.946 8	780.447 4	C ₄₈ H ₆₂ NO ₈
8.476 7	517.165 0	C ₃₃ H ₂₅ O ₆

4 结论

本研究基于代谢组学的方法, 从整体动物代谢物变化的角度研究小鼠血浆代谢物的 CCl₄ 肝损伤模型。不同与以往疾病模型从疾病本身所表现的现象中去选择指标, 代谢组学可以全面的表现疾病对机体整体的影响, 所选择的指标能全面地反映机体疾病的状态。通过采用 UPLC-TOF-MS 联用技术结合主成分分析的方法, 正常小鼠和肝损伤小鼠的血浆代谢产物在 PCA 图中得到了清晰地区分, 同时 CCl₄ 剂量的高低对肝脏损伤程度的差异也得以体现, 并最终确立了 10 个具有显著分类意义的生物标记物 (图 5)。本实验成功应用血浆代谢组学的方法建立 CCl₄ 肝损伤模型, 初步确定了小鼠肝损伤血浆

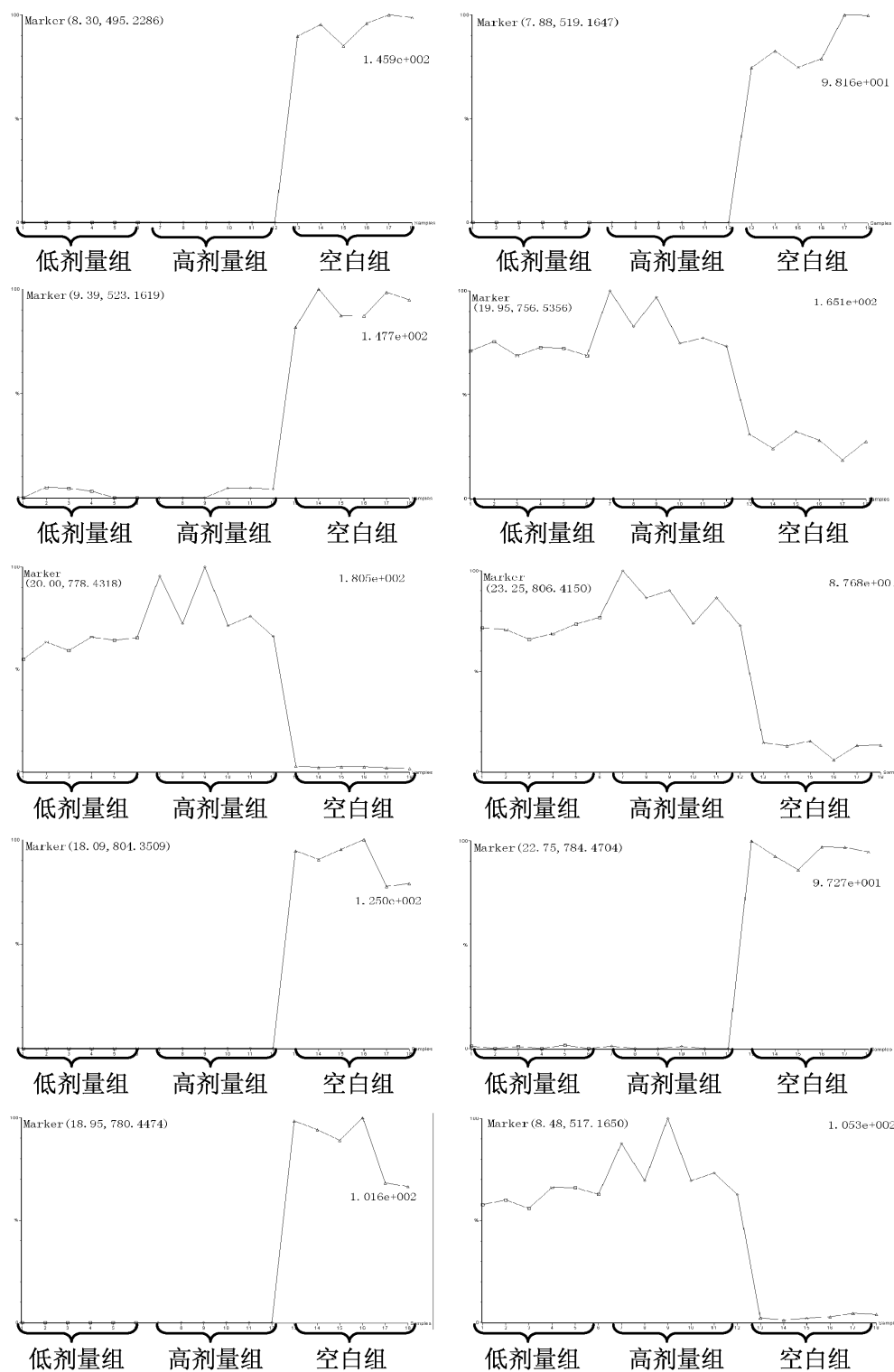


图 5 小鼠血浆中特异性生物标记物的变化趋势

代谢物研究模型的 CCl_4 用量, 为从内源性生化小分子新陈代谢的角度研究保肝药物提供了思路, 并为进一步研究中药的保肝作用提供了方法。

[参考文献]

[1] 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(11): 1181.

[2] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153.

[3] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 136.

[4] 万绍晖, 丁原全, 蒲晓辉, 等. 掌叶大黄蒽醌类衍生

物对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(11): 1405.

[5] 刘建文, 季光, 魏东芝. 药理实验方法学-新技术与新方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 168.

[6] Khaselev N, Murphy R C. Electrospray ionization mass spectrometry of lysoglycerophosphocholine lipid subclasses [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(4): 283.

[7] Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, et al. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 823(1): 26.

[8] Xiao Yi-jin, Benjamin Schwartz, Monique Washington, et al. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: Comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids [J]. *Anal Biochem*, 2001, 290(2): 302.

[责任编辑 邹晓翠]