

· 药物代谢 ·

## 不同防腐措施收集大鼠尿液对其内源性代谢物的影响

刘欢<sup>1</sup>, 高洁<sup>1</sup>, 尹晶晶<sup>1</sup>, 黄立群<sup>1</sup>, 许文黎<sup>1</sup>, 袁慧<sup>1</sup>, 岳娟<sup>1</sup>,  
秦秀军<sup>1</sup>, 李建国<sup>1\*</sup>, 田俊生<sup>2\*</sup>

- (1. 中国辐射防护研究院 药物安全性评价中心, 药物毒理与放射损伤药物山西省重点实验室,  
中核放射毒理与放射性药物临床前评价重点实验室, 太原 030006,  
2. 山西大学 中医药现代研究中心, 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 太原 030006)

**[摘要]** 目的:在大鼠尿液代谢组学研究中需要对尿液样本的采集过程采取必要的防腐措施,针对尿液收集过程中常用的几种防腐措施,研究其对尿液内源性代谢物的影响。方法:在大鼠尿液样本采集时采用冰上收集、加入叠氮化钠以及两者合用进行防腐,利用核磁共振代谢组学技术分析不同防腐措施的差异。结果:核磁共振代谢组学结果显示,冰组和叠氮化钠+冰合用组的主成分分析结果重合较多,且二者与空白组、叠氮化钠组均有较高的分离度;叠氮化钠组和空白组有小部分重叠,但是有分离的趋势。提示冰组与叠氮化钠+冰合用组的防腐效果相近,与空白组相比尿液中的缬氨酸、甜菜碱、马尿酸上升,丙氨酸和2-酮戊二酸下降。结论:在大鼠尿液代谢组学研究中,尿液样本采集时一定要低温防腐措施,在有防护条件时加入一定量叠氮化钠有助于提高防腐效果。

**[关键词]** 尿液;内源性代谢物;核磁共振代谢组学;叠氮化钠;冰;防腐措施;防护条件

**[中图分类号]** R22;R969.1;R28;C37;R446.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0120-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20182402

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1124.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-09-27 16:16

## Effect of Different Antisepsis Measures on Endogenous Metabolites in Rat Urine

LIU Huan<sup>1</sup>, GAO Jie<sup>1</sup>, YIN Jing-jing<sup>1</sup>, HUANG Li-qun<sup>1</sup>, XU Wen-li<sup>1</sup>, YUAN Hui<sup>1</sup>,  
YUE Juan<sup>1</sup>, QIN Xiu-jun<sup>1</sup>, LI Jian-guo<sup>1\*</sup>, TIAN Jun-sheng<sup>2\*</sup>

- (1. Drug Safety Evaluation Center, Shanxi Key Laboratory of Drug Toxicology and Drug for Radiation Injury, Key Laboratory of Radiological Toxicology and Preclinical Evaluation of Radiological Drugs in China National Nuclear Corporation, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China;  
2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**[Abstract]** **Objective:** In the study of urine metabolomics of rats, necessary antiseptic measures should be taken for collection of urine samples, the effect of several antiseptic measures on the endogenous metabolites in urine was studied. **Method:** The urine samples of rats were collected on ice, sodium azide was added, and both of them were used together to prevent corrosion. Differences of antiseptic measures were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics. **Result:** The results of NMR metabolomics showed that sodium azide + ice group and ice group had many overlaps, but they clearly separated with the control group and sodium azide group; sodium azide group and the control group had a small part overlap, but there was a tendency of separation. The antiseptic

**[收稿日期]** 20180523(004)

**[基金项目]** 山西省重点实验室开放基金项目(201605D111004)

**[第一作者]** 刘欢, 硕士, 研究实习员, 从事药物临床前安全性评价研究, Tel:0351-2203520, E-mail: happyliusxu@163.com

**[通信作者]** \* 田俊生, 博士, 副教授, 从事神经药理与新药研发研究, Tel:0351-7019297, E-mail: jstian@sxu.edu.cn;

\* 李建国, 博士, 研究员, 从事辐射生物效应研究, Tel:0351-2202239, E-mail: ljg2547@163.com

effect of sodium azide + ice group and ice group was similar; compared with control group, valine, betaine and hippuric acid in these two groups increased, but the alanine and 2-ketoglutaric acid decreased. **Conclusion:** In the study of rat urine metabolomics, low temperature antiseptic measures must be taken when urine samples are collected, and the addition of sodium azide can improve the antiseptic effect slightly under protective conditions.

[**Key words**] urine; endogenous metabolites; nuclear magnetic resonance metabolomics; sodium azide; ice; antiseptic measures; protective conditions

近年来,代谢组学技术快速发展,已广泛应用于生物医药研究的各个领域,尤其在中药研究、新药研发、疾病标志物发现等诸多方面展现出较好的优势<sup>[1]</sup>。代谢组学是系统生物学的重要组成部分,主要对生物体在遗传、疾病、药物、环境等内外因素的作用下内源性小分子代谢物的变化规律及其内在意义的研究<sup>[2-3]</sup>。核磁共振(NMR)技术是代谢组学研究中最常用的样本检测手段之一。高分辨 NMR 技术可以对处理后的组织、体液及植物等样本内的微量内源性代谢物进行检测与分析,能同时检测样本中数以百计的含氢化合物,有高通量、高灵敏度和重复性好等优点<sup>[4]</sup>。此外,NMR 检测所需样品量较少,样品处理或衍生措施简便,且属于无损性样品检测<sup>[5]</sup>。

尿样、血清是代谢组学分析中最常用的生物样本,这些样品的采集方法和前处理措施影响着结果的可靠性<sup>[6-7]</sup>。大鼠尿液样本的收集需要通过代谢笼,收集过程中尿液和粪便都会经代谢收集槽,导致尿液样本中混入粪便中的微生物。为了防止较长时间收集尿液时样本的变质,有研究者建议在代谢组学研究中尿液样本收集时应将收集瓶置于冰上并加入叠氮化钠<sup>[8]</sup>,但在实际应用中不同课题组有着不同的处理方法,通常是将尿样瓶放入加有冰的保温箱中防止腐败<sup>[9]</sup>,或者在尿样瓶中加入一定量的叠氮化钠<sup>[10]</sup>,再者是将尿样瓶置于冰上并加入叠氮化钠<sup>[11-12]</sup>。针对上述不同的处理方法,目前尚缺乏系统的对比研究。本实验采用 NMR 代谢组学技术考察上述 3 种不同防腐措施对大鼠尿液内源性代谢物的影响,以期为大鼠尿液的代谢组学研究提供一种明确的样本收集防腐措施。

## 1 材料

AVANCE III 型 600 MHz 核磁共振谱仪(德国布鲁克公司),TDL-5 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。叠氮化钠(美国 Sigma 公司,批号 S8032),重水(美国默克公司),三甲基硅烷丙酸钠盐(TSP,美国剑桥 CIL 公司)。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号

SCXK(京)2016-0006。饲养室温度控制在 20 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 70%,自然昼夜节律光照,适应性饲养 1 周后进行实验。本实验所用动物及相关实验处置符合动物福利的要求,实验开展前经过中国辐射防护研究院药物安全性评价中心动物福利委员会的伦理审查。

## 2 方法与结果

**2.1 动物分组** 大鼠在适应性饲养 1 周后,按体质量随机均分为 4 组,分别为空白组(K 组),冰组(B 组),叠氮化钠组(N 组),叠氮化钠加冰组(NB 组),每组 8 只。空白组的尿样瓶置于室温,不采取任何防腐措施;冰组的尿样瓶置于加有冰的保温箱中使尿液处于低温状态,瓶中不加叠氮化钠;叠氮化钠组的尿样瓶于室温放置,瓶中加入 1% 叠氮化钠溶液 0.5 mL<sup>[13]</sup>;冰加叠氮化钠组的尿样瓶置于加有冰的保温箱中,瓶中加入 1% 叠氮化钠溶液 0.5 mL。

**2.2 尿液收集与样本制备** 按照上述的动物分组,用大鼠代谢笼收集每只大鼠 12 h 的尿液,以 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液 500 μL 置于离心管中,加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 200 μL(磷酸盐缓冲液由重水配制,含 0.015% TSP),于 4 °C,13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,取上清液 600 μL 转移至核磁管中,待测。

**2.3 样品检测与图谱处理** 采用一维核欧沃豪斯效应谱(1D-NOESY)脉冲序列在核磁共振谱仪上进行检测。核磁共振图谱采用 MestReNova 8.0.1 软件处理。先进行定标、相位和基线的校准;去除 δ 4.6 ~ 4.9 和 δ 5.3 ~ 6.1,以消除水峰和尿素峰对数据的影响;再以 δ 0.04 为单位,对 δ 0.8 ~ 9.5 的谱图进行积分,将所得的数据进行归一化处理,并导入 SIMCA-P 13.0 软件进行多元统计分析。

**2.4 尿液的核磁共振图谱** 空白组大鼠尿液的<sup>1</sup>H-NMR 典型图谱见图 1,参照文献[14-16]并结合 Chenomx NMR Suite 7.6 软件,通过化学位移、峰型等数据,从谱图中指认出 22 种代谢物,主要包括氨基酸、脂质和糖类。指认出的代谢物化学位移及归属见表 1。

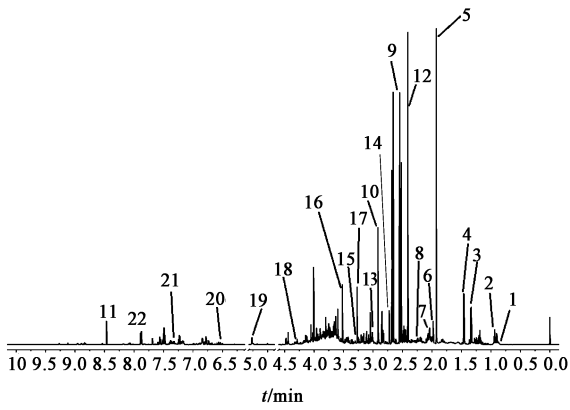


图 1 空白组大鼠尿液的<sup>1</sup>H-NMR 谱

Fig. 1 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of rat urine in blank group

表 1 空白组大鼠尿液中主要代谢物及其化学位移归属

Table 1 Main metabolites in urine of rats from blank group and their chemical shift attribution

| 编号 | 代谢物     | 化学位移                                   |
|----|---------|--|
| 1  | 亮氨酸     | 3.65 (d), 1.95 (m), 0.94 (t), 1.02 (d) |
| 2  | 缬氨酸     | 0.99 (d), 3.72 (t), 1.96 (m), 0.91 (d) |
| 3  | 乳酸      | 4.11 (q), 1.32 (d)                     |
| 4  | 丙氨酸     | 3.77 (q), 1.48 (d)                     |
| 5  | 乙酸      | 1.91 (s)                               |
| 6  | N-乙酰糖蛋白 | 2.04 (s)                               |
| 7  | O-乙酰糖蛋白 | 2.14 (s)                               |
| 8  | 乙酰乙酸盐   | 2.27 (s)                               |
| 9  | 柠檬酸     | 2.55 (d), 2.65 (d)                     |
| 10 | 三甲胺     | 2.93 (s)                               |
| 11 | 蚁酸      | 8.45 (s)                               |
| 12 | 琥珀酸     | 2.41 (s)                               |
| 13 | 2-酮戊二酸  | 2.45 (t), 3.01 (t)                     |
| 14 | 二甲胺     | 2.72 (s)                               |
| 15 | 牛磺酸     | 3.26 (t), 3.40 (t)                     |
| 16 | 甘氨酸     | 3.57 (s)                               |
| 17 | 甜菜碱     | 3.26 (s), 3.93 (s)                     |
| 18 | 苹果酸     | 4.31 (dd)                              |
| 19 | 尿囊酸     | 5.40 (s)                               |
| 20 | 延胡索酸盐   | 6.53 (s)                               |
| 21 | 苯乙酰甘氨酸  | 7.43 (m), 7.37 (m), 3.75 (d), 3.68 (s) |
| 22 | 马尿酸     | 3.98 (d), 7.56 (t), 7.65 (t), 7.84 (d) |

**2.5 多元统计分析** 大鼠尿液的<sup>1</sup>H-NMR 图谱难以进行直观分析,确定各组间的代谢物差异,因此需要通过多元统计分析对各组之间的差异代谢物进行量化比较。首先对复杂的核磁共振数据进行降维处理,采用无监督的主成分分析(PCA)对各组数据进行差异分析,见图 2。结果发现 K 组与 NB 组, B 组, N 组有较高的分离度; N 组与 NB 组, B 组也能明显区分;但 NB 组和 B 组重叠部分较多,说明两组之间

差异性较小。为进一步确定标志代谢物,采用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对 NB 组, B 组, N 组和 K 组进行单独分析,得 OPLS-DA 得分图和 S-plot 图,见图 3。S-plot 曲线中每个点代表 1 个变量,变量对分类的重要程度由变量重要性投影(VIP)值的大小来衡量。结果发现 NB 组, B 组, N 组与 K 组均能明显分开。根据 VIP 值 > 1 寻找差异代谢物,然后对相应 S-plot 曲线上离中心远且 VIP 值 > 1 的代谢物的积分面积进行 t 检验,最终找出潜在的生物标志物,见图 4。结果发现与 K 组相比, NB 组尿液代谢产物中缬氨酸、甜菜碱、马尿酸含量显著增加 ( $P < 0.01$ ),而丙氨酸和 2-酮戊二酸显著下降 ( $P < 0.01$ ); N 组丙氨酸和 2-酮戊二酸显著降低 ( $P < 0.05$ ); B 组缬氨酸和甜菜碱显著增加 ( $P < 0.05$ ),丙氨酸和 2-酮戊二酸显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),虽然马尿酸的改变没有显著性差异,但从平均值水平来看有增加的趋势。

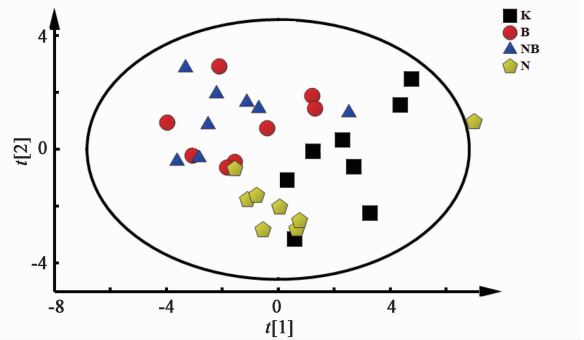


图 2 K 组, N 组, B 组, NB 组大鼠尿液<sup>1</sup>H-NMR 谱的 PCA 散点  
Fig. 2 PCA scatter plot of <sup>1</sup>H-NMR spectrum of rat urine from 4 groups

### 3 讨论

尿液作为一种收集简便、处理简单、包含大量信息的代谢终产物,在代谢组学的研究中应用广泛。但是尿液中含有许多利于微生物生长的营养物质,而这些微生物会影响样本的稳定性和可靠性。因此,在代谢组学研究中,尿液样本收集时应采取必要的防腐措施,在实际应用中通常是采取低温防腐、叠氮化钠防腐或两者合用,但关于不同措施对研究结果的可靠性研究却鲜有报道。

本研究进行了尿液样本收集防腐措施的考察。主要是室温下收集、低温下(冰)收集、室温下加叠氮化钠收集和低温下(冰)加叠氮化钠 4 种方法的研究。PCA 结果显示, NB 组, B 组, N 组与 K 组可以明显分开; N 组与 NB 组, B 组也是可以明显的分开;但 NB 组和 B 组却交杂在一起。说明大鼠尿液防腐措施中

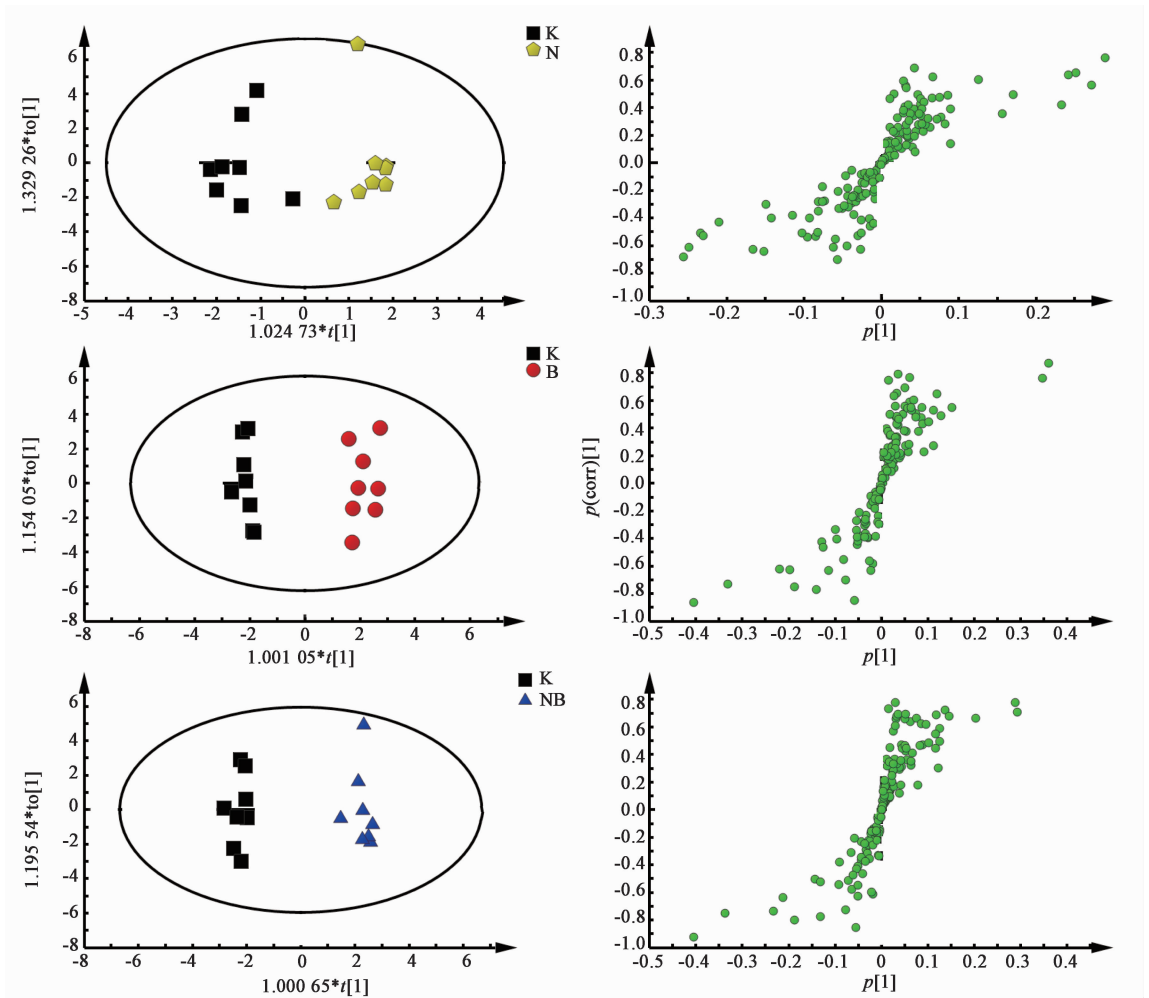
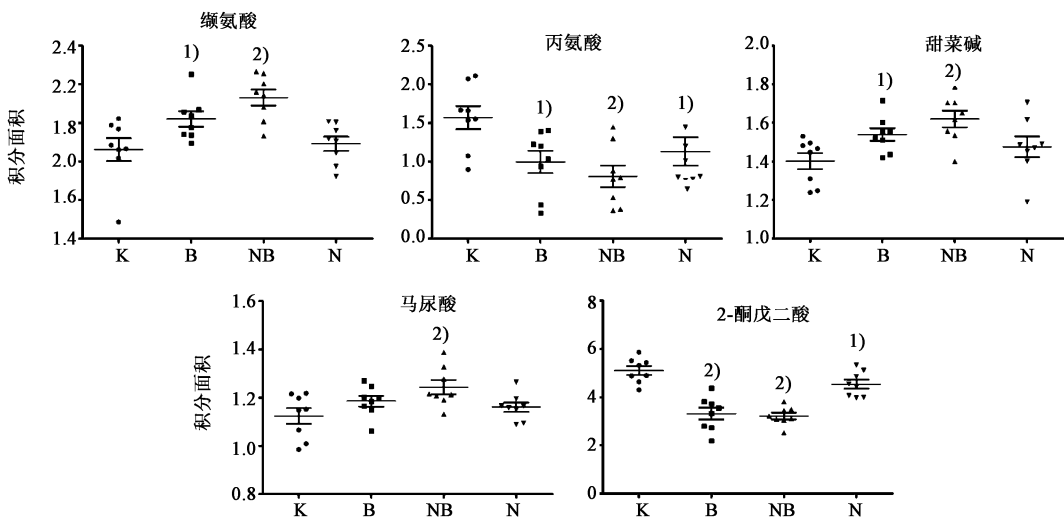


图 3 N 组, B 组, NB 组与 K 组大鼠尿液<sup>1</sup>H-NMR 谱的 OPLS-DA 散点和 S-plot 载荷

Fig. 3 OPLS-DA scatter plots and S-plot loading diagrams of <sup>1</sup>H-NMR spectrum of rat urine from 4 groups



与 K 组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 4 差异代谢物的核磁共振谱积分面积箱式分析

Fig. 4 Box diagram of mean peak area of differential metabolites in <sup>1</sup>H-NMR spectrum

低温措施较为关键,叠氮化钠在低温条件下防腐效果

增强,冰加叠氮化钠有良好的防腐效果。莫毛燕

等<sup>[11]</sup>、邹忠杰等<sup>[12]</sup>在大鼠代谢组学研究中,采用低温下(冰)加叠氮化钠方式对大鼠尿液进行防腐,数据结果表明该方式防腐效果较好,与本文研究结果一致。此外,本文研究结果还表明,低温(冰)能达到和冰+叠氮化钠类似的效果。提示低温(冰)可能是更为重要的一个因素。叠氮化钠是一种有毒的物质,可经呼吸道、消化道和皮肤进入人体,严重者可引起中毒死亡<sup>[17]</sup>。故综合考虑防腐效果和安全因素,在有充分的防护条件时,收集大鼠尿液样本可采取低温环境下加入叠氮化钠;而在没有相应的防护措施时,建议只采取低温措施。

本研究在收集尿液样本时,粪便和尿液都会经过代谢收集槽,导致尿液中会混入粪便中的微生物,其中数量最多的是大肠埃希氏菌。缬氨酸是组成蛋白质的 20 种氨基酸之一,也是人体必需的 8 种氨基酸之一,同时也是生糖氨基酸,用于合成蛋白质并提供需要的能量;乳酸杆菌、空肠弯曲菌属可将马尿酸变为安息香酸,而且马尿酸还是很多微生物可以利用的氮源;甜菜碱可以维持细胞渗透压,使细胞膜内外环境维持渗透平衡,起到保护细胞的作用,同时甜菜碱也是许多微生物代谢反应的甲基供体;这些代谢物可能被大肠埃希氏菌等微生物作为碳源或氮源利用,故而导致其在没有防腐措施的尿液中含量下降<sup>[18-19]</sup>。大肠埃希氏菌等微生物能够利用多种碳源代谢产生丙氨酸<sup>[20]</sup>;2-酮戊二酸是微生物三羧酸循环中重要的代谢中间产物,是细胞内碳-氮代谢的重要物质<sup>[21]</sup>;这 2 种代谢物都是微生物可以产生的,所以在没有防腐措施的尿液中含量是升高的。上述结论与本研究在差异代谢物 *t* 检验中得到的结果是一致的,说明在尿液样本收集时防腐措施是必不可少的。本研究只采用<sup>1</sup>H-NMR 对上述 3 种防腐措施进行了考察,后续将结合 LC-MS, GC-MS 等技术手段综合考察,以进一步验证结论的准确性,为尿液的前处理提供参考。

[参考文献]

[1] Heger M, van Golen R F, Broekgaarden M, et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2014, 66 (1): 222-307.

[2] TAN B B, XIANG D, JIA M, et al. The current status and perspective of metabonomics in breast cancer biomarker research [J]. *Sci Sin*, 2018, 48 (1): 15-23.

[3] Bruzzoniti M C, Checchini L, de Carlo R M, et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review [J]. *Anal Bioanal Chem*,

2014, 406 (17): 4089-4116.

[4] 李宁,范雪梅,王义明,等. 代谢组学及其分析技术的研究进展 [J]. *中南药学*, 2014, 12 (7): 668-673.

[5] 宋红,郑小伟,王颖,等. 基于核磁共振技术的益肾宁汤对支气管哮喘肾气虚证模型大鼠血清代谢组学的影响 [J]. *中医杂志*, 2016, 57 (11): 962-965.

[6] SHI H, LI X, ZHANG Q, et al. Discovery of urine biomarkers for bladder cancer via global metabolomics [J]. *Biomarkers*, 2016, 21 (7): 578-588.

[7] Jobard E, Trédan O, Postoly D, et al. A systematic evaluation of blood serum and plasma pre-analytics for metabolomics cohort studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (12): E2035.

[8] 冯利,曹芳瑞,刘新民,等. 非靶向代谢组学生物样品采集和制备方法探讨 [J]. *中南药学*, 2014, 12 (12): 1217-1221.

[9] Salek R M, Maguire M L, Bentley E, et al. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29 (2): 99-108.

[10] Johnson C H, Patterson A D, Krausz K W, et al. Radiation metabolomics. 4. UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics for urinary biomarker discovery in gamma-irradiated rats [J]. *Radiat Res*, 2011, 175 (4): 473-484.

[11] 莫毛燕,朱琼花,薛兴阳,等. 姜炭炮制前后对虚寒性出血症大鼠尿液代谢组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (16): 1-4.

[12] 邹忠杰,龚梦卿,谢媛媛,等. 氯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): 133-136.

[13] 曲卫玲. 基于代谢组学的琼玉膏延缓衰老作用评价及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.

[14] TIAN J S, PENG G J, GAO X X, et al. Dynamic analysis of the endogenous metabolites in depressed patients treated with TCM formula Xiaoyaosan using urinary <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158 (Pt A): 1-10.

[15] NIU Q Y, LI Z Y, DU G H, et al. <sup>1</sup>H-NMR based metabolomic profiling revealed doxorubicin-induced systematic alterations in a rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118: 338-348.

[16] 刘倩,符潮,周传社,等. 反刍动物瘤胃微生物限制性氨基酸代谢研究进展 [J]. *家畜生态学报*, 2017, 38 (2): 83-87.

[17] 何燕霞,翁小健,胡宁. 叠氮化钠中毒临床及神经电生理特点 [J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 28 (4): 259-261.

[18] 舒畅. 谷氨酰胺转氨酶在大肠杆菌中的表达研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.

[19] 任曼,宫碧霜,靳二辉,等. 大肠杆菌和氨基酸对猪小肠上皮细胞抗菌肽和信号通路蛋白表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2016, 28 (5): 1489-1495.

[20] Dona A C, Kyriakides M, Scott F, et al. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 135-153.

[21] 王艳,马亚茹,万学瑞,等. 多粘类芽孢杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *bglA*, *bglB* 和 *bgl* 基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *草业学报*, 2017, 26 (5): 189-196.

[责任编辑 刘德文]